



Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., R. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, H. Franzen-Karlsruhe i. B., E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin-Dahlem, M. Hahn-Berlin, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, K. Hess-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, L. Michaelis-Nagoya, H. Mollisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Ostwald-Leipzig, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, E. Salkowski-Berlin, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Berlin, A. Schlossmann-Düsseldorf, S. P. L. Sørensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., K. Suto-Kanazawa, T. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, E. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, A. v. Wassermann-Berlin, E. Widmark-Lund, W. Wichowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgenuth-Berlin

herausgegeben von
C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfunddreißigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer

1923

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Iwanoff, Nicolaus N. Über die Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen der Fruchtkörper von <i>Lycoperdon</i>	1
Sbarsky, B. Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro	21
Bach, A., B. Sbarsky und K. Nikolajew. Scheinbare auxo- und anti-fermentative Eigenschaften des Serums	32
Bach, A. und W. Engelhardt. Über Antiphenolase (Antilakkase) . .	39
Hagedorn, H. C. und B. Norman Jensen. Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid	46
Sarin, E. Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene . .	59
— — Weitere Studien über Invertase des Darmkanals der Honigbiene	75
Romeis, B. Untersuchungen über die Wirkung des Thyroxins. I. Mitteilung: Über die Wirkung des Thyroxins auf Körpergewicht und Leberglykogen weißer Mäuse	85
Goto, Kiko. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Wärmeregulation der Säugetiere. III. Wärmeregulation der weißen Ratte	107
Spiegel, E. A. und A. Löw. Der Kreatingehalt des Muskels bei anaerobischer Zuckung	122
Smorodinzew, J. A. und A. N. Adowa. Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus. Der Einfluß einiger Chinin- und Harnstoffverbindungen auf die «Proteasen»	128
Palladin, W.† und S. Manskaja. Die Entstehung der Peroxydase in den Pflanzen. Die Bedingungen, welche die Abspaltung der Peroxydase von den Protoplasten und ihren Übergang in den Zellsaft hervorgerufen	142
Gerlóczy, Géza v. und Franz Faludi. Stabilitätskoeffizient der Blutstruktur	158
Nishiguchi, H. Über ein Phänomen bei der Agglutination von Typhusbazillen in salzarmem Medium	165
Waterman, N. und J. Kalf. Über Nitroreduktionen durch lebende Gewebe	174
Orient, Julius. Über ein neues Reagenzglas	182
Franzen, Hartwig und Ernst Keyssner. Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. XXIII. Mitteilung. Kritisches über das Vorkommen der Äpfelsäure in den Pflanzen	183
Hoop, L. de und M. J. van Tussenbroek. Über den Einfluß von Dextrinen auf die Kristallisation von Maltose	217
Straub, H. und Klothilde Meier. Blutgasanalysen. XII. Wirkungen des konstanten und faradischen Stromes auf heterogene Systeme	224
Lieben, Fritz. Über das Verhalten von Brenztraubensäure und Acetaldehyd gegenüber mit Sauerstoff gelüfteter Hefe	240
Heubner, W. und P. Rona. Über den Kalkgehalt der Organe bei kalkbehandelten Katzen	248
Biedermann, W. Die Salzhydrolyse der Stärke	282
Eisler, M. und L. Portheim. Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweiß-Chlorophyllösungen	293
Hirai, Kinsaburo. Über das Vorkommen von p-Oxybenzaldehyd und p-Oxybenzoesäure bei der bakteriellen Tyrosinsetzung, mit besonderer Berücksichtigung des dabei gebildeten Melanins	299
Meyer-Bisch, Robert und Paul Thyssen. Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel bei Zuckerkranken. I. Mitteilung	308

	Seite
Beckmann, Kurt. Hämolyseversuche in Alkali- und Erdalkalisalzen unter normalen und pathologischen Bedingungen	317
Goto, Kiko. Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins. I.	329
Hári, Paul. Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins. II.	344
Petry, Eugen. Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen. III. Mitteilung. Wirkung von Oxydationsmitteln auf die Empfindlichkeit	353
Franzen, Hartwig und Fritz Helwert. Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. XXIV. Mitteilung. Kritisches über das Vorkommen der Citronensäure in den Pflanzen	384
Eisler, M. Über die Reaktion von Antigen und Antikörper nach Bindung des einen von ihnen an Kohle	416
Umetsu, Kojiro. Beiträge zur Elektroendosmose durch Kohlefilter	442
Borak, Jonas. Über den Einfluß des Säuren- und Basengehalts der Nahrung auf die Zusammensetzung des Harns wachsender Hunde	480
Loll, Wilhelm. Die quantitative Analyse der Knochenasche bei Kriegoosteopathie	493
Sasaki, Takaoki und Ichiro Otsuka. Über die Bildung der rechtsdrehenden β -Furyl- α -milchsäure durch Proteusbakterien	504
Krzywanek, Fr. W. Über die Verwendbarkeit des Zuntz-Geppert-Apparates bei Respirationsversuchen mit kleinen Tieren	506
Rippel, August. Über die Mobilisation der Mineralstoffe und des Stickstoffs aus Holz und Rinde beim frühjahrlichen Austreiben	518
Holm, Kurt und A. Bornstein. Über den Einfluß der Schilddrüse auf einige toxische Glykämien	532
Kürten, H. Untersuchungen über die Wirkungsweise von Formaldehyd auf Organkolloide. II. Mitteilung. Formaldehyd und Eiweißquotient	536
Bleyer, B. und H. Schmidt. Studien über das Verhalten der wichtigsten Kohlehydrate (Glucose, Galactose, Fructose, Mannose, Maltose, Lactose, Saccharose) in stark saurer, alkalischer, sulfid- und bisulfidhaltiger Lösung. I. Mitteilung. Die Inversion der Lactose mit starken Säuren	546
Meyerhof, O. und H. Weber. Beiträge zu den Oxydationsvorgängen am Kohlemodell	558
Hishikawa, T. Über die Bestimmung zell- und keimschädigender Substanzen auf biologischem Wege. III. Mitteilung. Chinin	576
Blühdorn, Kurt und Grete Genck. Zur Kritik der de Waardschen Mikromethode	581
Tutschku, Karl. Pigmente im Pferdehaar	585
Haehn, Hugo. Abbau der Stärke durch ein System: Neutralsalze + Aminosäuren + Pepton. (Vorläufige Mitteilung)	587
Morinaka, Kiyoshi. Wirkt Vitaminmangel spezifisch oxydationshemmend?	603
Soda, T. Neue Beobachtungen über die Stimulation der alkoholischen Gärung durch chemisch definierte Körper	611
— — Zur Kenntnis der Glucose-mono-schwefelsäure und Rohrzucker-mono-schwefelsäure. V. Mitteilung	621
Berichtigung	628
Autorenverzeichnis	629

Über die Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen der Fruchtkörper von *Lycoperdon*.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg.)

(Eingegangen am 1. September 1922.)

Im August 1916 hatte ich folgenden Versuch ausgeführt: Einige frische unverletzte Fruchtkörper des Pilzes *Lycoperdon piriforme*, an welchen keine Spuren einer Differenzierung des Capillitiums zu bemerken waren, wurden in einen Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur gebracht. Schon nach Verlauf von 3 bis 4 Tagen erhielt man den Eindruck, daß die Fruchtkörperchen reifen; sie waren vertrocknet, schwarz geworden und beim Spalten gaben sie eine Menge Sporen ab. Die Wasserentziehung erwies sich als einer der Faktoren, welche den Reifungsvorgang beschleunigen.

Da ich gerade im Besitz großer Mengen dieser Pilze war, stellte ich mir die Aufgabe, die Umwandlung des Harnstoffs und der stickstoffhaltigen Substanzen während des Reifens derselben zu verfolgen.

Recht bald erwiesen die Versuche, daß das Reifen der Pilze auch dann stattfindet, wenn man die vom Mycel befreiten Fruchtkörperchen während 3 bis 4 Tagen auf Filtrierpapier bei Zimmertemperatur liegen läßt und dann bei 35° C trocknet.

Versuch 1. Es wurden unreife Fruchtkörper von *Lycoperdon piriforme* gewählt, sorgfältig mit Wasser von fremdartigen Beimengungen gesäubert, mit Filtrierpapier abgetrocknet und dann auf zwei Anteile zu je 1 kg verteilt.

Der Anteil A (Kontrolle) wurde zerkleinert und dann schnell getrocknet, erst bei 35°, zuletzt bei 105° bis zum konstanten Gewicht.

Der Anteil B wurde auf Filtrierpapier während 3 Tagen bei Zimmertemperatur liegen gelassen. Die Zellen der Pilze verloren ihren Turgor. Das allgemeine Aussehen der Pilze wies auf einen deutlich ausgeprägten Reifungsprozeß hin; sie waren schwarz geworden und in ihnen hatte sich das Capillitium mit Sporen ausgebildet; danach wurden die Pilze bei 35° und dann bei 105° bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Der Anteil A (unreif) und der Anteil B (reifend) wurden zu feinem Pulver verrieben.

Es ergaben sich zwischen ihnen folgende Unterschiede:

A (unreif).

1. Aus 1 kg wurden 114 g trockne Substanz erhalten.
2. Gesamtmenge des Stickstoffs 7,12 %.
3. Graues Pulver.
4. Der Alkoholextrakt ist von etwas gelblicher Farbe.
5. Das Pulver wird vom Wasser benetzt.
6. Nach Abwaschen mit Alkohol und Quellen im Wasser bildet es eine schleimartige Masse, welche sich kaum filtrieren läßt (Viskosität).

B (reifend).

1. Aus 1 kg wurden 95 g trockne Substanz erhalten.
2. Gesamtmenge des Stickstoffs 8,74 %.
3. Dunkelbraunes Pulver.
4. Der Alkoholextrakt ist von dunkler Farbe.
5. Das Pulver wird vom Wasser nicht benetzt.
6. Nach Bearbeitung mit Alkohol bildet es keine schleimartige Masse beim Benetzen mit Wasser.

Beim Reifen der Pilze findet eine Abnahme der Trockensubstanz um 19 g (114 bis 95) statt und eine Zunahme des Stickstoffs, dessen Menge von 7,12 % auf 8,74 % gestiegen war.

Da die Abnahme der Trockensubstanz proportional der Zunahme des Stickstoffgehalts ist, so kann man hieraus den Schluß ziehen, daß während des Reifens ein energisches Verbrennen der stickstofffreien Substanz stattfindet¹⁾.

Um dem Einwand vorzubeugen, daß die Gewichtsabnahme durch Einsaugen einiger Mengen Extraktivstoffe ins Filtrierpapier hervorgerufen sein könnte, habe ich einen zweiten Versuch angestellt.

Versuch 2. Zehn große unreife Fruchtkörper von *Lycoperdon saccharum* wurden der Länge nach in zwei gleiche Teile zerschnitten; jeder Teil hatte ein Rohgewicht von 90 g.

Anteil A (Kontrolle) wurde gleich in kleine Stücke geschnitten und an einem Fädchen erst bei 35°, dann bei 105° getrocknet.

Anteil B: Zehn halbe Fruchtkörper wurden an ein Fädchen gehängt und reiften im Verlauf von 8 Tagen bei Zimmertemperatur; dann wurden sie bei 105° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. In allen Hälften der Fruchtkörper hatte sich eine große Menge Sporen gebildet.

Auf 1 kg Rohgewicht wurde erhalten: Trockengewicht Anteil A 114,4 g; Anteil B 100,0 g.

Diese Gewichtsabnahme scheint in der Hauptsache auf Kosten der Trehalose vor sich zu gehen.

Ich erhielt durch Kochen des feinen Pulvers von unreifen Pilzen mit Alkohol einen Extrakt, welcher beim Stehen große (bis 5 mm) rhombische Kristalle ausschied, die die Fehlingsche Flüssigkeit nur nach Hydrolyse mit Säure reduzierten. Der Schmelzpunkt der Kristalle, 100°, entspricht

¹⁾ Bemerkenswert ist die Tatsache einer Zunahme der gesamten Stickstoffmenge beim Reifen: 1 kg unreifer Pilze enthält insgesamt 8,1168 g Stickstoff, während in 1 kg reifender Pilze 8,3030 g vorhanden sind. Das gleiche Resultat wurde in einer ganzen Reihe von Versuchen erhalten; der Grund dieser Erscheinung ist vorläufig noch nicht aufgeklärt.

der Trehalose ($C_{12}H_{22}O_{11} + 2 H_2O$). Bis jetzt ist es mir nicht gelungen, die Trehalose in derselben Weise aus reifenden Pilzen auszuschcheiden.

Im nächsten Versuch verfolgte ich die Gewichtsveränderungen der Trehalose beim Reifen der Pilze.

Versuch 3. Es wurden zwei Anteile unreifer Fruchtkörper von *Lycoperdon piriforme* genommen. Das Reifen fand unter denselben Bedingungen wie im Versuch 1 statt. Die Anteile wurden gepulvert und von dem unreifen Material 7,166 g (5,75 % Gesamt-N), vom reifenden 6,695 g (6,92 % Gesamt-N) entnommen. Beide Anteile wurden im Soxhletschen Apparat erst 4 Stunden mit Äther und nach Entfernung desselben zweimal mit Alkohol je 12 Stunden extrahiert; nach dem Erkalten schieden die Alkoholextrakte große rhombische Kristalle aus, deren Menge nach Absaugen und Trocknen im ersten Falle (unreifes Material) 0,6018 g, im zweiten Falle (reifendes Material) 0,0533 g betrug.

Nach dem Umkristallisieren wurden reine Kristalle von Trehalose erzielt, welche auf Grund des Schmelzpunktes (100°) und des Verhaltens zur Fehlingschen Flüssigkeit identifiziert wurde.

Dieser Versuch zeigt uns den großen Verbrauch von Trehalose beim Reifen. Hier selbst finden wir auch eine Erklärung dafür, daß die Trehalose von E. Bourquelot (1891) zuerst nur in jungen Pilzen entdeckt worden ist.

Da ich mir die Verfolgung des Schicksals der stickstoffhaltigen Substanzen beim Reifen zur Aufgabe gemacht hatte, so mußte ich zuerst beim Harnstoff verweilen.

Bamberger und Landsiedl¹⁾ hatten bei der Untersuchung der *Lycoperdon*arten zum erstenmal das Vorkommen des Harnstoffs in der Pflanzenwelt entdeckt. Anfangs waren sie der Meinung, daß der Harnstoff aus dem Harn weidender Tiere in die Pilze gelangt war, da die *Lycoperdone* an solchen Stellen gut gedeihen. Da sie aber in den Pilzen keine anderen Elemente des Harns und im Boden selbst keinen Harnstoff vorfanden, so folgerten sie, daß der Harnstoff als Stoffwechselprodukt im Pflanzenkörper erscheint. Gaze²⁾ gewann Harnstoff nicht nur aus reifen Exemplaren, wie Bamberger und Landsiedl, sondern auch aus unreifen Bovisten (*Lycoperdon*). Bei *L. cervinum* hatte Gaze keine Spuren von Harnstoff erhalten.

Da der *Lycoperdon piriforme*, mit dem ich arbeitete, in betreff des Harnstoffgehalts von früheren Autoren nicht untersucht worden war, so begann ich damit, seine Anwesenheit nachzuweisen. Ohne große Mühe gelang es mir, sein Vorkommen sowohl in unreifen als auch in reifen Pilzen festzustellen. Er wurde mit Alkohol auf dem Wasserbade extrahiert; nach Abdampfen des Alkohols wurde der in Wasser lösliche Teil mit Salpetersäure bearbeitet. Nach mehrtägigem Stehen im Exsikkator schied sich eine dunkelfarbene kristallinische Masse aus. Die Kristalle wurden auf einer Nutsche abgesaugt, in

¹⁾ M. Bamberger und A. Landsiedl, Monatsh. f. Chem. 24, 218, 1903.

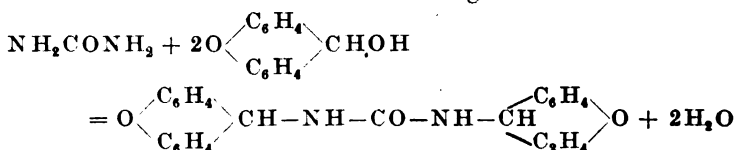
²⁾ R. Gaze, Arch. d. Pharm. 248, 78, 1905.

Wasser gelöst und die erhaltene Lösung mit Kohle gekocht. Aus dem farblosen Filtrat schieden sich völlig weiße Blättchen aus. Der Schmelzpunkt (139 bis 140,5°) und andere Eigenschaften derselben wiesen auf salpetersauren Harnstoff hin.

Goris und *Masché*¹⁾ führten eine Reihe von Harnstoffbestimmungen in Pilzen aus und kamen in einigen Fällen zu sehr interessanten Resultaten. So enthielten die reifen Fruchtkörper vom Champignon (*Psalliota campestris*) bis 4,30 % Harnstoff, auf Trockengewicht berechnet, während in den jungen Pilzen dessen Menge bedeutend kleiner war. Als die Autoren dieselbe Art des Pilzes — aber künstlich in der Umgegend von Paris kultiviert — untersuchten, fanden sie in keinem Falle Harnstoff. Die Autoren sind geneigt, diesen Unterschied in der chemischen Zusammensetzung ein und derselben Pilzart dadurch zu erklären, daß die Pilze in den beiden untersuchten Fällen zu zwei benachbarten morphologischen Rassen gehören. In weiteren Versuchen fanden *Goris* und *Masché* keinen Harnstoff selbst in denjenigen Lycoperdonarten vor, in welchen *Bamberger* und *Landsiedl* sein Vorkommen konstatiert hatten. „Nous ne l'avons pas retrouvée non plus dans Lycoperdon Bovista et *L. gemmatum* Fl., où *Bamberger* et *Landsiedl* l'avaient signalée.“ Obgleich die Autoren den Harnstoff mit einer nicht sehr scharfen Methode bestimmt haben (sie haben ihn als Oxalat ausgeschieden), so ist es doch unzweifelhaft, daß in ein und derselben Pilzart die Harnstoffmenge variieren und selbst bis auf Null heruntergehen kann.

Mir schien es daher sehr wichtig, die Umwandlungen des Harnstoffs beim Reifen der vom Mycel befreiten Lycoperdonexemplare unter den analogen, oben beschriebenen Verhältnissen zu verfolgen. Aber zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs bediente ich mich der Methode von *R. Fosse*²⁾. Alle älteren Bestimmungsmethoden des Harnstoffs besaßen keine große Empfindlichkeit, während die Fällung durch Xanthydrol in 50- bis 70proz. Essigsäurelösung, nach *Fosse*, die Ausscheidung eines kristallinischen Harnstoffderivats ermöglicht, welches leicht in reinem Zustande zu erhalten ist und ein hohes Molekulargewicht (420) hat, während das Molekulargewicht des Harnstoffs nur 60 beträgt.

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Dieses Derivat — Dixanthylharnstoff — läßt sich leicht aus einer mit anderen Substanzen verunreinigten Lösung kristallisieren und identifizieren. Das *Fossesche* Verfahren ermöglicht, den Harnstoff in einer Lösung 1:1000000 zu bestimmen und 0,0001 g Harnstoff auszukristallisieren. Durch Anwendung seines Verfahrens war es *Fosse* gelungen, die allgemeine

¹⁾ *Goris* und *Masché*, C. r. 753, 1082, 1911.

²⁾ *R. Fosse*, C. r. 1912 bis 1913; Ann. de l'Institut Pasteur 30, 1, 1916.

Verbreitung des Harnstoffs in der Tier- und Pflanzenwelt zu konstatieren, obgleich die Mengen desselben oft sehr gering waren; so z. B. erhielt er nach einer Behandlung von 100 Flußkrebsen nur 0,0047 g Harnstoff. Die Anwesenheit von Harnstoff wurde auch bei vielen als Nahrung dienenden Pflanzen, wie Zichorie, Melone, Kürbis, Blumenkohl, Spinat, Mohrrübe, Schnittkohl, Kartoffel und auch bei den Schimmelpilzen *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* festgestellt. Die Menge des von ihm entdeckten Harnstoffs war äußerst gering; so z. B. wurde der Saft von 10 kg Blättern der Gartenzichorie mit Essigsäure in einer Verdünnung von 1:1000 angesäuert, filtriert, im Vakuum auf dem Wasserbade eingedampft und nach Ansäuerung mit Essigsäure bis zu 70 % mit einer alkoholischen Xanthydrolösung (1:10) gefällt; die Menge des so erhaltenen Niederschlags war sehr gering (der Autor gibt das Gewicht nicht an), und nur der Schmelzpunkt 261° ermöglichte die Feststellung, daß hier das Harnstoffderivat vorlag.

Die Auffindung des Harnstoffs in solchen Mengen erscheint nicht besonders auffallend, da vor seiner Entdeckung in Pilzen von *Kossel* daselbst auch die Anwesenheit von Harnsäurederivaten, wie Xanthin, Adenin und anderen konstatiert worden ist. Nachdem *Bamberger* und *Landsiedl* in den *Lycoperdon*-arten Harnstoff in großen Mengen festgestellt haben und *Fosse* ein äußerst empfindliches Verfahren zur Bestimmung desselben ausgearbeitet hat, so müssen die Pflanzenphysiologen die Bedeutung der Harnstoffbildung in den Pilzen klarstellen und das Schicksal desselben bei der Bildung des Fruchtkörpers verfolgen.

Nachdem ich gefunden hatte, daß die *Lycoperdone* nach ihrer Entfernung vom Mycel in kurzem Zeitraum (s. Versuch 1) unter großer Trockengewichtsabnahme reifen, schien es mir von großer Wichtigkeit zu sein, die Umwandlungen des Harnstoffs während dieses Zeitraums zu verfolgen, und besonders wichtig bei den *Lycoperdon*-arten, bei denen die Harnstoffmenge bis zu 3,5 % des Trockengewichts beträgt. In einer vorläufigen Mitteilung¹⁾ habe ich konstatiert, daß die Mengen des nach *Sachse* bestimmten Amidstickstoffs bei den auf verschiedenen Stufen des Reifens entnommenen *Lycoperdonen* variiert. So fand ich z. B. auf 100 mg Gesamtstickstoff:

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| 1. bei unreifen Exemplaren | 22,5 mg, |
| 2. „ reifenden „ | 27,8 „ |
| 3. „ Sporen | 16,9 „ |

Diese Resultate erzielte ich am Material des Versuchs 1; die Pilze wurden gepulvert, dann 3 Stunden mit 10 % H_2SO_4 hydrolysiert und nach beinahe völliger Neutralisation das Ammoniak im Vakuum nach Zugabe von Calciumoxyd bei 40° abdestilliert.

Eine vergleichende Fällung dieses Materials nach *Stutzer* ergab auf 100 mg Gesamtstickstoff:

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| 1. bei unreifen Exemplaren | 56,4 mg |
| 2. „ reifenden „ | 68,3 „ |
| 3. „ Sporen | 85,4 „ |

¹⁾ *N. Iwanoff*, Journ. de la Société bot. de Russie 2, 129, 1917.

Natürlich besitzen diese Zahlen nur einen vergleichenden Charakter, und auf keinen Fall kann hier eine Rede vom absoluten Gehalt an Eiweißstickstoff in den erwähnten Anteilen sein. Im nachstehenden wurde bei der Harnstoffbestimmung folgendermaßen verfahren: eine abgewogene Menge des gepulverten und bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrockneten Pilzes wurde im *Soxhletschen* Apparat mit Äther extrahiert, dann, nach Entfernung des Äthers, zweimal je 10 Stunden mit Alkohol; nach Entfernung des Alkohols wurde das Material zweimal mit Wasser auf dem Wasserbade extrahiert; in den Extrakten wurde der Harnstoff durch Fällung mit Xanthidrol in 70proz. Essigsäure bestimmt.

Versuch 4. Das Pulver unreifer Exemplare von *Lycoperdon piriforme*, die aber bereits deutliche Anzeichen beginnender Reifung aufwiesen, wurde bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Der Gesamtstickstoff desselben betrug 8,55 % (0,2600 g ergaben 22,23 mg N). Zu dem Versuch wurden 80 g dieses Pulvers verwendet, deren Stickstoffmenge also 6,84 g ausmachte. Der Anteil wurde im *Soxhletschen* Apparat während 10 Stunden mit Äther, 24 Stunden mit Alkohol ohne Erwärmen, dann wieder im *Soxhlet* mit Alkohol 20 Stunden und zuletzt 12 Stunden extrahiert.

Stickstoff wurde extrahiert:

	Extrakt ccm	Stickstoff mg	
1. Alkoholischer	90	77,9	} 936,4
2. „	140	568,5	
3. „	80	280,0	
4. Wässeriger	310	1182,8	} 1558,2
5. „	330	375,2	

In einzelnen Proben von 5 und 10 ccm wurde die Harnstofffällung mit Xanthidrol unter Zugabe von Eisessigsäure bis zu 70 % ausgeführt; der Niederschlag wurde auf einer Nutsche gesammelt, mit Alkohol gewaschen, getrocknet, gewogen, als Dixanthylharnstoff identifiziert und dessen Stickstoffgehalt bestimmt. Die Angaben der einzelnen Proben sind auf den ganzen Anteil umgerechnet.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt:

	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Stickstoff des Harnstoffs mg	Proz. des Harnstoffstickstoffs in bezug auf den Gesamtextrahenten N
1. Alkoholischer	735	48,9	62,8
2. „	4 374	291,3	51,2
3. „	1 700	113,2	40,4
4. Wässeriger	6 809	453,5	48,9
5. „	2 751	183,2	48,9
Im ganzen	16 369	1090,1	
Gesamtstickstoff im Anteil			6,840 g
Stickstoff mit Alkohol und Wasser extrahiert			2,4846 g
oder			36,3 %

In 80 g sind enthalten 1,319 g Harnstoff, berechnet auf Trockengewicht 1,65 %.

Versuch 5. Es wurden völlig reife Exemplare von *Lycoperdon piriforme* gewählt. 80 g wurden in derselben Weise wie im vorigen Versuch behandelt.

Auffallend war bei den Pilzen dieser Sammlung der verhältnismäßig geringe Gesamtstickstoffgehalt im Anteil, der im ganzen 6,21 % betrug (0,5270 g gaben 32,5 mg N; 0,4480 g gaben 28,0 mg N).

Extrahierte Stickstoffmenge:

	Extraktions- dauer Std.	Extrakt ccm	N mg
1. Alkoholischer	20	100	171,5
2. „	20	160	145,6
1. u. 2. Wässeriger	—	480	848,5
3. „	—	230	150,9
			317,1
			999,4

In einzelnen Proben zu 5 und 10 ccm wurde die Harnstoffmenge wie im Versuch 4 bestimmt, die Angaben auf den ganzen Anteil von 80 g Trockengewicht und 5,0 g N umgerechnet.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt:

Extrakte	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Stickstoff des Harnstoffs mg	Proz. des Harnstoffstickstoffs in bezug auf den Gesamtextrahenten N
1. Alkoholischer	708	47,2	27,4
2. „	368	24,5	16,8
1. u. 2. Wässeriger	708	47,2	5,6
3. „	—	—	—
Im ganzen	1789	118,9	—

Wenn man die Resultate der Versuche 4 und 5 vergleichen will, so muß bemerkt werden, daß der gesamte Stickstoffgehalt sehr variierte und von der Sammlung der Pilze abhing. Deswegen kann ohne Vorbehalt kein Vergleich zwischen diesen beiden Versuchen stattfinden, aber als zweifellose Tatsache ergibt sich eine große Harnstoffabnahme bei reifen Pilzen im Vergleich zu denen, die erst zu reifen beginnen.

80 g unreifer ergaben 1090,1 mg Harnstoffstickstoff

80 g reifer „ 118,9 mg „

Noch ein Resultat dieser Versuche muß an dieser Stelle angeführt werden, nämlich die Schwierigkeit der Harnstoffextraktion mit Alkohol; trotz der allgemein gut bekannten Löslichkeit in Alkohol läßt sich der Harnstoff aus den Pilzen im *Soxhlet*schen Apparat nur schwer extrahieren. Nach einer Extraktionsdauer von 56 Stunden im Versuch 4 betrug der Auszug nur 453,4 mg (auf N berechnet), während nach ergänzender Extraktion mit Wasser 636,7 mg Harnstoffstickstoff ausgeschieden wurden. Hieraus folgt zweifellos, daß der Harnstoff in den

Pilzen nicht in freiem Zustande enthalten ist, sondern mit anderen Verbindungen in irgend einer chemischen, vermutlich sehr labilen Bindung vorliegt, da schon eine zweimalige Behandlung mit heißem Wasser die Lösung dieser Bindung bewirkt.

In den nachstehenden Versuchen bediente ich mich der Pilze ein und derselben Sammlung, um gut vergleichbare Resultate zu erhalten.

Versuch 6. Zwei Portionen kleiner Fruchtkörper von *Lycoperdon piriforme* ein und desselben Alters, an ein und derselben Stelle gesammelt, wurden in zwei Anteile zu je 190 g Rohgewicht geteilt.

Anteil A wurde zerkleinert, schnell ausgetrocknet, erst bei 30°, dann bei 110°; beim Pulverisieren waren keine Sporen zu bemerken, die Farbe war weiß.

Anteil B (unzerkleinerte Fruchtkörper) wurden 7 Tage lang auf Papier der Reifung überlassen, dann getrocknet, anfangs bei 30°, zuletzt bei 110°; die Pilze waren völlig reif geworden; es hatten sich Sporen gebildet; das Pulver war dunkelgrün.

Die gesamte Stickstoffmenge nach *Kjeldahl*:

Anteil A 5,75 % N (0,4487 g ergaben 25,82 mg N).
 „ B 6,92 % N (0,3956 g „ 27,39 mg N).

Zum Versuch wurde dann Pulver entnommen:

A (unreife) 7,1660 g mit 412,1 mg Gesamtstickstoffgehalt,
 B (reifend) 6,6950 g „ 503,3 mg „

Um einen bequemeren Vergleich zu erzielen, wurden die erhaltenen Resultate auf 503,3 mg N berechnet, d. h. alle für den Anteil A erhaltenen Zahlen wurden mit 1,221 multipliziert (503,3 : 412,1).

Die Pulver beider Anteile wurden einer Extraktion im *Sorleth*schen Apparat unterworfen.

1. Mit Äther 4 Stunden, dann nach Entfernung des Äthers
2. mit Alkohol 11 Stunden und von neuem
3. mit Alkohol 12 Stunden und nach Entfernung des Alkohols dreimal mit kochendem Wasser auf dem Wasserbade.

In einzelnen Proben der Extrakte wurde der gesamte Stickstoffgehalt bestimmt.

Die Menge des gesamten N in Milligrammen:

Extrakte	Anteil A	Anteil B
1. Alkoholischer	61,6	84,0
2. „	19,4	14,0
1. Wässriger	51,7	47,7
2. u. 3. „	17,0	9,3
Im ganzen	149,7	155,0

Der Harnstoff wurde in einzelnen Proben der Extrakte, welche mit Essigsäure bis auf 70 % angesäuert waren, durch Einwirkung einer 10proz. alkoholischen Xanthydrolösung gefällt.

Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt:

Extrakte	A unreife		B reife	
	Dixanthylharnstoff mg	N des Harnstoffs mg	Dixanthylharnstoff mg	N des Harnstoffs mg
1. Alkoholischer	0	0	408,0	27,2
2. „	0	0	Spuren	Spuren
1. Wässeriger	274,3	18,3	182,2	12,1
2. u. 3. „	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Im ganzen	274,3	18,3	592,2	39,3

Der Dixanthylharnstoffniederschlag wurde einer Stickstoffanalyse unterzogen.

0,2000 g ergaben 13,20 mg N, d. h. 6,60 % N; theoretisch 6,66 % N.

Auffallend ist der geringe Harnstoffgehalt in den Pilzen dieser Sammlung, aber wenn man die Harnstoffmengen der Anteile A und B vergleicht, so müssen wir konstatieren, daß die Menge desselben während des Reifens stark zugenommen hat.

Der Dixanthylharnstoffniederschlag betrug: im Anteil A 274,3 mg, im Anteil B 592,2 mg.

In diesem Falle überrascht die Unmöglichkeit, den Harnstoff im Anteil A mit Alkohol zu extrahieren und die schwierige Extrahierbarkeit im Anteil B. Ein 23stündiges Extrahieren mit Alkohol im *Soxhlet*schen Apparat ergab keine Spuren von Harnstoff, während durch die nachfolgende Behandlung mit heißem Wasser 274,3 mg Dixanthylharnstoff gewonnen wurden. Es ist klar, daß hier der Harnstoff nicht als solcher, sondern in labiler Verbindung mit anderen Substanzen vorliegt. Es war nötig, die Menge des Amidstickstoffs nach *Sachse* zu bestimmen, um eine Möglichkeit zur Beurteilung der Entstehungsquellen des Harnstoffs zu erhalten.

Die Portionen A und B wurden 3 Stunden mit 10 % H_2SO_4 gekocht, dann die ganze Masse nahezu neutralisiert und das Ammoniak nach Zugabe von Calciumoxyd bei 40° und 15 mm Druck abdestilliert.

A: 0,8725 g mit 50,17 mg Gesamt-N ergaben 3,27 mg Ammoniak-N

B: 1,7935 g „ 124,1 mg „ „ 10,13 mg „

Durch Umrechnung auf eine Portion von 503,3 mg N ergibt A 32,8 mg, B 41,1 mg Amidstickstoff.

Somit hatte die Menge des Amidstickstoffs beim Reifen zugenommen, und trotz der verhältnismäßig großen Menge Amidstickstoff in der Portion A, nämlich 32,8 mg, wurden nur 18,3 mg Harnstoffstickstoff daselbst erhalten. Wahrscheinlich geht der Harnstoffbildung die irgend einer labilen Stickstoffverbindung voraus, die beim Kochen mit 10 % H_2SO_4 Ammoniak liefert.

Im Alkoholextrakt der Portion A wurde kein Harnstoff festgestellt; deswegen wurde in den alkoholischen Extrakten beider Portionen der Stickstoff nach *Sachse* bestimmt; in einzelnen Proben wurde der Alkohol durch Destillation entfernt und nach dreistündigem Kochen mit 10 % H_2SO_4 das Ammoniak nach Zugabe von Calciumoxyd bei 40° und 15 mm Druck abdestilliert.

	N in der Probe mg	Amid-N in der Probe mg	Amid-N in dem gesamt. alk. Extrakte der Portion mg
A	10,29	1,96	15,5
B	18,66	3,49	18,3

Im Alkoholextrakt wurde ebenso eine Zunahme der Amidstickstoffmenge beim Reifen der Pilze festgestellt. Trotz des Fehlens von Harnstoff im Alkoholextrakt der Portion A ist in demselben doch irgend eine labile Substanz vorhanden, die bei dem Verfahren von *Sachse* Stickstoff ausscheidet.

Versuch 7. Wiederholung des vorigen. Fruchtkörper aus einer neuen Sammlung. Portionen A und B zu je 200 g Rohgewicht.

Aus 200 g Trockengewicht (getrocknet bei 110° C) ergab sich:

A (unreife): 23,23 g mit 3,49 % Gesamtstickstoff

B (reifende): 21,40 g „ 4,19 % „

Aus 1 kg Rohgewicht wurden erhalten:

In Portion A 116,4 g Trockengewicht.

„ „ B 107,0 g „

Somit ergab sich beim Reifen ein sehr großer Verbrauch der stickstofffreien Substanz. Auffallend ist der geringe Gehalt an Gesamtstickstoff im Vergleich zu den Angaben anderer Versuche. Darum können nur parallele Portionen von ein und derselben Sammlung als Material zur Betrachtung der Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen dienen.

In diesen Portionen wurde die Menge des Ammoniak- und des Amidstickstoffs bestimmt. Die zu 2 g abgewogenen trockenen Pulver jeder Portion wurden nach Zugabe von Wasser und Calciumoxyd bei 40° und 15 mm destilliert, in einigen Fällen unmittelbar (Stickstoff der ammoniakalischen Salze), in anderen nach vorhergehendem dreistündigen Kochen mit 10 % H_2SO_4 (Amidstickstoff).

2 g Ausgangsmaterial ergaben:

	Ammoniak-N mg	Amid-N mg
Portion A	1,09	5,01
„ B	1,74	5,23

Dann wurden die abgewogenen Substanzmengen der Portionen A, 16,44 g, und B, 13,70 g, mit 574 mg Gesamtstickstoffgehalt der gewöhnlichen Extraktion im *Sorhletschen* Apparat mit Äther, zweimal mit Alkohol und dreimal mit kochendem Wasser unterzogen.

Im ganzen ergab sich extrahierter Stickstoff:

Extrakte	Portion A mg	Portion B mg
Alkoholische	97,5	64,8
Wässrige	57,4	36,6
Im ganzen	154,9	101,4

Die Harnstoffbestimmung ergab folgende Resultate.

Dixanthylharnstoffniederschlag in den Extrakten:

	A unreife mg	B reife mg
Alkoholische	0	37,2
Wässerige	Spuren	Spuren

In der unreifen Portion waren nur Spuren von Harnstoff aufzufinden, während in der reifenden wägbare Mengen vorhanden waren.

Ich bestimmte auch die Amidstickstoffmenge in den alkoholischen Extrakten.

Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt.

Für die Portionen A und B mit 57,4 mg Gesamtstickstoffgehalt:

	Amid-N in der Portion mg	Amid-N in dem alk. Auszug mg	Harnstoff-N in dem alk. Auszug mg
A	41,1	11,8	0
B	35,8	6,8	2,48

Trotz der großen Menge des nach *Sachse* bestimmbaren Stickstoffs fand sich in der Portion der unreifen Pilze kein Harnstoff. Somit beträgt die Harnstoffmenge in unreifen Pilzen manchmal Null, manchmal eine bestimmte Größe, aber stets eine geringere als bei reifenden Pilzen, wie aus den Versuchen 6 und 7 zu ersehen ist. Aber bei völlig reifen Pilzen sinkt die Harnstoffmenge wieder und verschwindet ganz in den Sporen. Diese Tatsachen illustriere ich noch durch zwei Versuche.

Versuch 8. Vier große unreife Fruchtkörper *Lycoperdon saccatum* von einem Gewicht von 160 g wurden der Länge nach in zwei Hälften zerschnitten; so gelangte man zu zwei völlig gleichen Portionen von je 80 g Rohgewicht mit 734,1 mg Gesamtstickstoffgehalt.

Portion A wurde zerschnitten, schnell getrocknet, erst bei 30°, dann bei 110°; das Pulver war von etwas dunkler Färbung, Sporen waren nicht zu ermitteln.

Portion B wurde bis zum völligen Reifen 10 Tage auf Papier liegen gelassen, wonach sich eine Menge Sporen gebildet hatte; die Farbe des Pulvers war dunkelgrün.

Es wurde die Menge des gesamten Stickstoffs bestimmt.

Portion A: 0,3007 g ergaben 28,70 mg N = 9,54 %	} 9,47 % N.
0,2103 g „ 19,78 mg N = 9,40 %	
„ B: 0,2832 g ergaben 28,35 mg N = 10,01 %	} 9,99 % N.
0,2547 g „ 25,38 mg N = 9,96 %	

Entnommen wurde vom Pulver der Portion

A: 6,2873 g mit 595,4 mg N,

B: 5,5169 g „ 551,6 mg N.

Wie üblich, wurde mit Äther, Alkohol und Wasser extrahiert; in den Extrakten wurde der Gesamt- und der Harnstoffstickstoff bestimmt. Zur Bequemlichkeit wurden die Resultate des Versuchs auf den Gesamtstickstoff der Hälften, d. h. auf 734,1 mg umgerechnet.

Die Stickstoffmenge der Extrakte in Milligrammen:

	A unreife mg	B reife mg
1. Alkoholischer	150,9	185,9
2. „	28,3	9,7
1. Wässeriger	53,8	52,2
2. u. 3. „	25,3	11,6
Im ganzen	258,3	259,4

Die Harnstoffmenge:

	A unreife		B reife	
	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff N mg	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff N mg
1. Alkoholischer	551,5	36,7	932,1	62,1
2. „	34,6	2,3	21,3	1,4
1. Wässeriger	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
2. u. 3. „	—	—	—	—
Im ganzen	586,1	39,0	953,4	63,5

Die Stickstoffmenge des Harnstoffs war von 39,0 mg in den unreifen Hälften bis auf 63,5 mg in den reifenden Hälften gestiegen. Von Interesse war, daß die Sporen in der Portion B sich *innerhalb* der Hälften des Fruchtkörpers gebildet hatten, aber an der Schnittfläche fehlten sie vollständig; das Gewebe blieb von außen weiß und bedeckte die Sporen von dunkler Farbe¹⁾.

Noch einen Versuch mit vollständig reifen Pilzen führe ich hier an.

Versuch 9. Sieben große Exemplare vollständig reifer Fruchtkörper von *Lycoperdon saccatum* wurden getrocknet, in kleinere Stücke zerschnitten, der Stiel des Pilzes vom oberen Teile, dem Capillitium, getrennt; aus dem letzteren wurden die Sporen ausgeschüttelt, das Capillitium und der Stiel des Pilzes wurden pulverisiert.

Es ergab sich im ganzen Trockensubstanz:

Sporen	23,42 g
Capillitium	6,20 g
Stiel	5,60 g

Im ganzen . . . 35,22 g

d. h. das Gewicht der Sporen im Fruchtkörper beträgt 69 % des Gesamtgewichts des ganzen Pilzes.

Eine große Portion Sporen von 13,5 g wurde einer Extraktion mit Äther, Alkohol und Wasser unter den oben genannten Verhältnissen unter-

¹⁾ Außerdem wurden zu je 0,52 g Ausgangsmaterial beider Anteile genommen und der Harnstoff *nur mit Wasser* extrahiert.

	A	B
Dixanthylharnstoffniederschlag	42,0 mg	82,0 mg
Harnstoffstickstoff	2,8 „	5,5 „
Harnstoff	6,0 „	11,7 „
Harnstoff, ber. auf Trockengewicht (0,52 g)	1,15 %	2,25 %

zogen. Ebenso wurde mit dem Capillitium verfahren. In allen Extrakten wurde versucht, den Harnstoff nach *Fosse* zu bestimmen, aber die Resultate fielen völlig negativ aus, mit Ausnahme des wässerigen Extrakts aus dem Capillitium, in welchem ein geringer Dixanthylniederschlag, etwa gegen 6 mg, erhalten wurde.

Hieraus folgt, daß die Harnstoffmenge beim Reifen zunimmt (Versuch 8) und in den Sporen verschwindet (Versuch 9). Es erregt die Aufmerksamkeit auch die Tatsache, daß in den Sporen die Menge des mit Alkohol und Wasser extrahierbaren Stickstoffs in bedeutendem Grade abnimmt. So wurde im Versuch 8 aus reifenden Pilzen (einer Portion von 734,1 mg N) extrahiert:

mit Alkohol . . .	195,6 mg N oder 26,7 % N
„ Wasser . . .	63,8 mg N „ 8,7 % N
im ganzen . . .	259,4 mg N oder 35,4 % N

Aus den Sporen im Versuch 9 (Portion von 1000,4 mg N):

extrahiert mit Alkohol . .	40,9 mg N oder 4,1 % N
„ „ Wasser . .	10,4 mg N „ 1,0 % N
im ganzen .	51,3 mg N oder 5,1 % N

Die Abnahme des extrahierbaren Stickstoffs von 35,4 bis auf 5,1 % weist darauf hin, daß beim Reifen die löslichen Stickstoffprodukte des Capillitium in Verbindungen übergehen, welche in Alkohol und Wasser unlöslich sind und sich in den Sporen ablagern. Zu dieser Erkenntnis kam ich schon 1917¹⁾, als ich die Mengen des extrahierbaren Stickstoffs in verschiedenem physiologischen Zustande bestimmte.

Ich erhielt, auf eine Portion von 100,0 mg umgerechnet, in den Extrakten Stickstoff in Milligrammen:

Unreife:	Alkoholischer . . . 19,0	} 38,1
	Wässeriger . . . 19,1	
Reifende:	Alkoholischer . . . 19,1	} 32,1
mit Sporen:	Wässeriger . . . 13,0	

Nach Ausschütteln der Sporen aus dem Fruchtkörper von reifenden Pilzen ergab sich:

Capillitium:	Alkoholischer . . . 28,5	} 45,1
	Wässeriger . . . 16,6	
Sporen:	Alkoholischer . . . 10,1	} 17,1
	Wässeriger . . . 7,0	

Im gegebenen Falle wurde nach *Sachse* die Menge des Amidstickstoffs bestimmt.

Wenn man die Menge des gesamten Stickstoffs in der Portion zu 100 annimmt, so erhalten wir Stickstoff nach *Sachse*:

Unreife	22,5 mg
Reifende	27,8 mg
Sporen	7,3 mg

Hieraus sehen wir, daß die Menge der löslichen Stickstoffverbindungen, des Stickstoffs nach *Sachse*, wie auch die Menge des Harnstoffs in den Sporen stark abnimmt und im letzten Falle bis auf Null sinkt.

¹⁾ N. Iwanoff, l. c.

Welche Rolle spielt der Harnstoff in der Pflanze und wie ist seine Bildung und Umwandlung beim Reifen der Pilze zu erklären?

In der Literatur finden wir nur lückenhafte Meinungen über diesen Gegenstand. *Bamberger* und *Landsiedl*, *Goris* und *Masché*, *Fosse* warfen die Frage über die Harnstoffentstehung in den Pflanzen auf. Die Annahme, daß seine Anwesenheit mit Resten von tierischen Exkrementen verbunden sei, mußte fallen, wenn vom Pflanzenmaterial sorgfältig alle möglichen Verunreinigungen abgewaschen worden waren. Als endgültig in dieser Frage gelten die Angaben von *Fosse*, welcher bewies, daß *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum*, in sterilen Verhältnissen aufgewachsen, Harnstoff bilden, und daß in den Keimlingen der Erbse mehr Harnstoff enthalten ist als in den Samen. Nach diesen Versuchen erscheint der Harnstoff als ein physiologisches Produkt der Pflanzenzelle¹⁾. *Goris* und *Masché*, welche den Harnstoff bei verschiedenen Pilzen vorfanden, konnten die Frage noch nicht beantworten, ob sich der Harnstoff während des Prozesses einer normalen Ernährung oder während des Trocknens bildet.

Ich führe noch einen meiner Versuche an, der eine Antwort auf diese Frage geben wird.

Versuch 10. 200 g junge *Lycoperdon piriforme* wurden der Länge nach in zwei Anteile zerschnitten. Anteil A = 100 g; die Pilze wurden in Stücke zerschnitten und trockneten auf Filtrierpapier.

Anteil B = 100 g wurde 7½ Monate in 150 ccm Alkohol aufbewahrt. Nach Verlauf dieses Zeitraums wurde die ganze Pilzmasse im Mörser zerrieben, auf einer Nutsche abgesaugt und mit Alkohol gewaschen.

Beide Portionen wurden zerkleinert und dann einer Extraktion mit Alkohol im *Soxhlet* Apparat und zuletzt mit Wasser unterzogen. In den Extrakten wurde die Menge des Gesamtstickstoffs und des Harnstoffs bestimmt.

Der extrahierte Stickstoff betrug im

	A an der Luft mg	B in Alkohol mg
1. Alkoholischen Extrakt . . .	112,6	245,9
2. " " " . . .	31,2	58,9
3. Wässerigen " " " . . .	91,6	46,9
Im ganzen	235,4	351,7

In einzelnen Proben wurde Harnstoff bestimmt, dessen Menge sich in beiden Anteilen als beinahe gleich erwies:

Extrakte	A an der Luft		B in Alkohol	
	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff- stickstoff mg	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff- stickstoff mg
1. Alkoholische	120,0	8,0	221,0	14,6
2. Wässerige	339,6	21,8	138,0	9,1
Im ganzen	459,6	29,8	359,0	23,7

¹⁾ Le végétal est, comme l'animal, capable de créer l'urée, *Fosse*, l. c., 1916.

In der getrockneten und in der in Alkohol konservierten Portion erwies sich die Harnstoffmenge ziemlich gleich; die geringe Abnahme in der Portion B (alkoholische) kann dadurch erklärt werden, daß die Urease eine Spaltung des Harnstoffs hervorgerufen hat, da 62proz. Alkohol (bei Annahme eines Wassergehaltes in frischen Pilzen gegen 90 %) natürlich die Arbeit der Fermente nicht unterbindet, wie aus den zahlreichen Arbeiten *Bourquelots*¹⁾ und seiner Schule hervorgeht. Durch Einwirkung spaltender Fermente kann man also die schlechte Übereinstimmung der Mengen des mit Alkohol und Wasser extrahierbaren Stickstoffs in beiden Portionen erklären. Der große Überschuß von 351,7 mg in der Alkoholportion im Vergleich zu 235,4 mg in der Luftportion, ergibt sich nach meinen vorläufigen Versuchen aus der Bildung von Glucosaminderivaten aus Chitin und Pilzschleimmasse [das Viscosin früherer Autoren²⁾].

Nachdem gezeigt worden ist, daß die Pflanzenzelle imstande ist, Harnstoff zu erzeugen, verliert die Erklärung von *Fosse*, daß der Harnstoff aus dem Boden geschöpft werden könne, „soit partiellement, soit en totalité à la terre végétale, où l'urée existe et se forme d'après nos nombreuses expériences“, beträchtlich an Gewicht, obgleich der Harnstoff in Anbetracht seiner leichten Löslichkeit und schnellen Wanderung durch Membranen ohne vorherigen Zerfall durch die Zellen der Wurzel in die Gewebe der Pflanzen geraten könnte.

Solcher Ansicht ist *Weyland*³⁾, welcher zahlreiche mykotrophische Pflanzen auf ihren Harnstoffgehalt untersucht hat. In den meisten Fällen enthielten die obligaten Mykotrophen und alle vom Autor untersuchten Orchideen Harnstoff. Bei den echten Autotrophen fand der Autor meistens nur ammoniakalische Salze, aber keinen Harnstoff vor. Dort aber, wo derselbe konstatiert wurde (bei einigen Schachthalmen (*Equisetum*) und Farnen auf sumpfigem Boden), erklärt der Autor dessen Anwesenheit dadurch, daß diese Pflanzen den Harnstoff (oder Substanzen, aus welchen derselbe abgespalten wird) aus dem Boden aufnehmen.

Wir lassen die Fälle, in denen eine Einwanderung des Harnstoffs in die Pflanze von außen in Frage kommt, beiseite und wenden uns zur Harnstoffbildung in der Pflanze selbst. Literaturangaben auf diesem Gebiete fehlen fast gänzlich. Aber über die Frage der Harnstoffbildung in der Pflanze besitzen wir doch reichliches Material. Schon *Pasteur*⁴⁾ hatte gezeigt, daß der Zerfall des Harnstoffs bei ammoniakalischer Gärung mit der Tätigkeit bestimmter Bakterien verbunden ist. Sogar vor Entdeckung des Harnstoffs in der Pflanze hatte *Semal*⁵⁾ auf die Anwesenheit von Urease

¹⁾ *E. Bourquelot*, Journ. de pharm. et de chim. 1912–1917.

²⁾ Viscosin spaltet sich nach meinen Untersuchungen, die ich in nächster Zeit zu veröffentlichen beabsichtige, in Glucosamin + Phosphorsäure.

³⁾ *H. Weyland*, Jahrb. f. wiss. Bot. 51, 1, 1912.

⁴⁾ *Pasteur*, C. r. 50, 819, 1860.

⁵⁾ *O. Semal*, Ann. d. pharm. 4, 279.

in Pilzen hingewiesen. Auf die Untersuchungen von *Shibata*¹⁾, welcher die Urease im Mycel des *Aspergillus niger* vorfand, folgt eine ganze Reihe von Arbeiten. *Takeuchi*²⁾ fand die Urease in dem Samen der Sojabohne vor. *Kiesel*³⁾ und eine Reihe anderer Autoren wiesen auf die große Verbreitung der Urease in der Pflanzenwelt hin. Die Autoren beurteilten die Tätigkeit der Urease auf Grund der Ammoniakbildung nach Harnstoffzugabe von außen. *Kiesel*⁴⁾, welcher eine große Zahl Pflanzenobjekte auf ihren Ureasegehalt untersuchte, konnte nur bei sehr wenigen Pflanzen (innere Zwiebeln, Wurzel von *Beta vulgaris* und *Daucus Carota*, alle Organe der Kartoffel und *Pelargonium*) das Fehlen dieses Ferments nachweisen, aber selbst hier kann man den Einwand machen, daß eine kleine Menge Ammoniak nicht übergehen konnte, da das Medium Zucker enthielt. Die fast allgemeine Verbreitung der Urease in den Pflanzen steht nach den Versuchen von *Fosse*⁵⁾ vollständig im Einklang mit dem Vorkommen des Harnstoffs, ja selbst die Mengen des Harnstoffs und des denselben spaltenden Ferments stehen in einem bestimmten Verhältnis zueinander. *Fosse* fand in den ruhenden Samen der Erbse nur Spuren von Harnstoff (auf 1 kg Samen weniger als 0,01 g), während dessen Menge in einmonatlichen Keimlingen bedeutend zunahm (auf 1 kg Keimlinge 0,64 g Harnstoff). In den Versuchen *Kiesels*⁴⁾ war in ruhenden Samen von *Vicia sativa* die Urease wenig aktiv: von 0,5 g Harnstoff zerfielen nur 0,0116 g; aber als zum Versuch zehntägige Samenlappen derselben Pflanze genommen wurden, wurde im analogen Falle um 11mal mehr (0,130 g) Harnstoff zersetzt; dieselben Samenlappen zeigten, nachdem sie die vorrätigen Substanzen im Verlauf von 28 Tagen verbraucht, wieder eine Abnahme der Urease (0,0100 g Harnstoff wurden zersetzt). Charakteristisch ist, daß bei diesen Versuchen die Menge der Urease in den Blättern zehnmal mehr beträgt als in den Wurzeln und 20mal mehr als in den Stengeln. *Fosse* hat das Verzeichnis der Urease enthaltenden Pflanzen bedeutend vergrößert. Er hat festgestellt, daß die gleichzeitige Anwesenheit des Harnstoffs und der Urease von tiefer physiologischer Bedeutung ist.

Nach *Fosse* ist der Harnstoff für die Ernährung der Pflanzen ebensowenig wie für die der Tiere geeignet. „L'urée est un produit d'excrétion des végétaux comme des animaux.“ In diesem Falle besteht die Rolle der Urease darin, daß sie einen zur Assimilation unfähigen Körper in zwei Nährstoffe — Ammoniak und Kohlensäure — verwandelt. Würde die Urease fehlen, so würden die Pflanzen Stickstoff in Form von Harnstoff ausscheiden, wie es bei den Tieren der Fall ist. Bei Beurteilung der Rolle der Urease hat der Autor einen Umstand außer acht gelassen. Wir wissen, daß das in den Pflanzen weit verbreitete Ferment Arginase eine Spaltung des Arginins in Ornithin und Harnstoff hervorruft, wir haben alle Ursache anzunehmen, daß in

¹⁾ K. *Shibata*, Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol. 5, 388, 1904.

²⁾ T. *Takeuchi*, Jour. Coll. Agric. Tokyo 1, 1, 1909.

³⁾ A. *Kiesel*, Zeitschr. f. phys. Chem. 75, 169, 1911; 118, 247—300, 1922.

⁴⁾ A. *Kiesel*, l. c., p. 247, 1922.

⁵⁾ *Fosse*, l. c., 1916.

der lebenden Pflanze dieses Ferment diese Reaktion in umgekehrter Richtung ausführt, und daß der Harnstoff bei der Synthese des Arginins ganz eintreten kann; dieselbe Rolle kann der Harnstoff in den Pflanzen bei der Bildung der Purinbasen spielen. Hier liegen die Gründe, warum die Behauptung von *Fosse*, daß ein ganzes Molekül des Harnstoffs ohne vorherigen Zerfall zur Ernährung nicht ausgenutzt werden könne, nicht angenommen werden kann. Es ist nicht außer acht zu lassen, daß in den meisten Fällen die Menge des in den Pflanzen auftretenden Harnstoffs sehr gering ist und völlig gedeckt wird von der Menge, die im Molekül des Arginins enthalten ist, und daß einzig der reiche Harnstoffgehalt bei einigen Pilzen (*Lycoperdon*, *Champignon*), welcher die Bedürfnisse des Arginin- und Purinbasenaufbaues bedeutend übertrifft, der Fall sein kann, auf welchen die Erwägungen von *Fosse* anwendbar sind.

Was den Mechanismus des Harnstoffzerfalls in der Pflanze anbetrifft, so kann man sich ohne Schwierigkeiten den Verlauf der Reaktion in folgendem Sinne darstellen:



aber der Mechanismus der Harnstoffsynthese aus Ammoniak und Kohlensäure ist uns nicht klar. Wir besitzen kein experimentelles Material, welches auf die Reversibilität der oben bezeichneten Reaktion hinwiese.

Die Angaben von *Kiesel* (1911), welcher zeigte, daß der Harnstoffzerfall durch Urease der Weizenkeime bis zu 91,66 % beträgt und diejenigen von *Marshall*¹⁾, daß dieser Zerfall 98 % erreicht, wenn man das Ferment der Sojabohnensamen nimmt, und daß die Zerfallsreaktion nie bis zu Ende verläuft, sprechen für die Möglichkeit einer Umkehrbarkeit des fermentativen Prozesses. Aber die experimentelle Prüfung der synthetischen Wirksamkeit der Urease, die von *Wakeman* und *Dakin*²⁾ mit der Leber, und von *Kiesel* (1916) mit Pflanzenobjekten unternommen worden war, führte zu negativen Resultaten. Da die Auffindung der Bedingungen, unter denen das Ferment die inverse Reaktion bewirkt, eine sehr schwierige Sache ist, die Möglichkeit einer solchen Entdeckung aber nicht ausgeschlossen ist, so bleibt diese Frage gegenwärtig ungelöst.

Wie vollzieht sich die Synthese des Harnstoffs im Tierkörper?

Die anfänglichen Vermutungen (*Dumas et Cahours*, 1842), daß der Harnstoff durch Isomerisation des Ammoniumcyanats entstehe, wie bei *Wöhler*, fallen fort, da sie keine experimentelle Bestätigung fanden. *E. Abderhalden*³⁾ bestätigt ebenso bei der Berührung der Frage über die Harnstoffentstehung im tierischen Organismus: „es ist auch nicht gelungen, im Organismus Cyansäure aufzufinden“. Nach *A. Bechamp*⁴⁾, welchem es

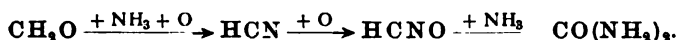
¹⁾ *E. Marshall*, Journ. biol. chem. 14, 283, 1913; 15, 495, 1913.

²⁾ *A. Wakeman* und *H. Dakin*, Journ. biol. chem. 9, 327, 1911.

³⁾ *E. Abderhalden*, Lehrbuch, S. 320. 1909.

⁴⁾ *A. Bechamp*, C. r. 48, 548, 1856.

gelang, Harnstoff aus Eiweißstoffen durch Oxydation mit Kaliumpermanganat zu erhalten und nach *Hofmeister*¹⁾, welcher gezeigt hat, daß viele stickstoffhaltige und stickstofffreie Substanzen durch Oxydation in Gegenwart von Ammoniak Harnstoff liefern, befaßte sich *Fosse* mit dieser Frage. Mit Hilfe seines empfindlichen Verfahrens zur Harnstoffbestimmung zeigte er, daß viele Kohlehydrate, Glycerin und Formaldehyd als C-Quellen für die Harnstoffsynthese dienen können, wenn man sie in Gegenwart von Ammoniak und Permanganat oxydiert. Diese Reaktion wurde von *Fosse* genau untersucht, im Verlauf derselben wurden intermediäre Substanzen aufgefunden, unter welchen Cyansäure nachgewiesen und ausgeschieden wurde²⁾. Der Autor gibt ein genaues Verfahren zur Ausscheidung derselben in Form des Silbersalzes an. Die große Harnstoffausbeute bei Verwendung des Formaldehyds (auf 100 Teile Formaldehyd werden durch Erwärmen mit Ammoniumsalzen 140 Teile Harnstoff erzielt), führte den Autor zu der Hypothese, daß bei künstlicher Oxydation der Kohlehydrate in Gegenwart von Ammoniak diese Substanz ein Vorläufer des Harnstoffs sei. Zwischen dem Formaldehyd, welcher als Assimilationsprodukt erscheint und als Ausgangsmaterial bei der Synthese des Harnstoffs vom Autor angenommen wird, und der HCNO, welche derselbe bei künstlicher Oxydation organischer Substanzen entdeckt hat, soll, nach seiner Ansicht, noch eine des öfteren in Pflanzen nachgewiesene Substanz, die Blausäure, HCN, eingeschaltet werden. Der Prozeß der Harnstoffbildung durch Oxydation läßt sich also nach *Fosse* durch folgendes Schema ver sinnbildlichen:



Solange keine experimentellen Angaben, welche die Anwesenheit der Cyansäure im Organismus belegen, beigebracht werden, kann dieses Schema nicht angenommen werden. Was aber die oxydative Bildung des Harnstoffs anbetrifft, so können die Erwägungen von *Fosse* in bezug auf die Analogie der Harnstoffbildung bei seinen Oxydations-synthesen und in lebenden Organismen, durch die Ergebnisse meiner Versuche über die Harnstoffbildung bei der Reife der Lycoperdonen gestützt werden. Tatsächlich nimmt beim Reifen der Pilze die Atmung sehr stark zu, weiter findet eine bedeutende Erwärmung der Fruchtkörper statt, die Menge der Trockensubstanz — 114 g (Versuch 1) — in unreifen Pilzen sinkt beim Reifen bis auf 95 g, es ergibt sich eine Abnahme von 16,7% Trockengewicht. Diese Angaben weisen auf einen lebhaften Oxydationsprozeß beim Reifen hin; parallel damit findet eine Anreicherung des Harnstoffs, welcher als Zwischenglied im Gang der Synthese komplizierter Stickstoffverbindungen erscheint, statt. Wenn dieser Prozeß der Harnstoffsynthese in Fruchtkörpern, welche sich am Mycel befinden, stattfinden würde, also unter Bedingungen, die die Zuführung des nötigen Stickstoffs in Form von

¹⁾ *F. Hofmeister*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **87**, 426, 1896.

²⁾ *R. Fosse*, Ann. de l'Institut Pasteur **34**, 715, 1920; siehe auch *E. A. Werner*, Dublin, Jour. of med. science **4**, 577.

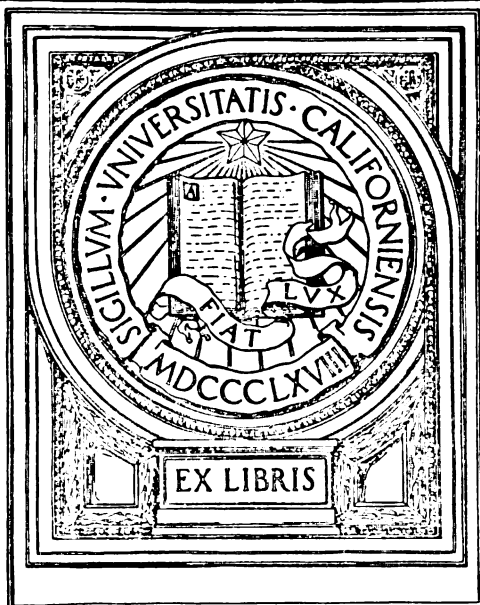
Ammoniak ermöglichen, so wäre der Aufbau des Harnstoffmoleküls sehr klar: im Fruchtkörper sind anwesend Ammoniak, Kohlehydrat (Trehalose) und ein mächtiger Apparat von Oxydationsfermenten; in meinen Versuchen fällt der erste dieser Faktoren, das Ammoniak, fort, denn dessen Menge ist in den Pilzen äußerst gering; die Destillation des Ammoniaks aus dem Versuchsmaterial ohne vorheriges Kochen mit Säure ergibt äußerst geringe Zahlen; so z. B. wurden im Versuch 7 aus 2 g Material nur 1,09 mg Ammoniakstickstoff erhalten; aber selbst hier kann man nicht behaupten, daß dieser Stickstoff aus Ammoniak oder Ammoniumsalzen stammt, da in den Pilzen labile Stickstoffverbindungen enthalten sind, die bei der Destillation Ammoniak liefern. Es muß zugegeben werden, daß als Material zur Harnstoffsynthese gewisse labile Stickstoffverbindungen, welche nach dem Kochen mit 10proz. Schwefelsäure Ammoniak abspalten (Amidstickstoff nach *Sachse*), dienen können. Die Menge dieses so gebundenen Stickstoffs ist ziemlich bedeutend, auch dann, wenn kein Harnstoff vorhanden ist (Versuch 7), und seine Menge übertrifft stets die Quantität des Harnstoffstickstoffs, wie aus dem Versuch 6 zu ersehen ist:

	Amid-N mg	Harnstoff-N mg
A unreife	32,8	18,3
B reifende	41,1	39,3

Hier haben wir sowohl eine Zunahme des Amidstickstoffs als auch des Harnstoffstickstoffs beim Reifen. Vorläufig kennen wir die Zusammensetzung dieser Verbindungen, von denen sich bei der Harnstoffbildung Ammoniak abspaltet, nicht, aber wir sehen, daß der Harnstoff als Zwischenprodukt bei der Synthese stickstoffhaltiger Substanzen der Pilzsporen erscheint, da diese kein Carbamid mehr enthalten. Soviel wir bis jetzt von der Fermentwirkung im lebenden Körper wissen, können wir in der Harnstoffanhäufung beim Reifen der Pilze nicht das Resultat einer unkoordinierten Tätigkeit des Organismus erblicken. Wenn der Harnstoff nur ein Zwischenprodukt in einer Reihe von chemischen Umwandlungen wäre, so wäre seine Menge in den Lycoperdonen nicht so groß. In diesem Falle erscheint der Harnstoff unzweifelhaft als Stickstoffvorratssubstanz, welche einerseits ganz, andererseits nach Spaltung in Ammoniak und Kohlensäure verbraucht wird. *Boussingault*¹⁾ hat längst ein allgemeines Bild der Oxydationsprozesse bei Pflanzen und Tieren gegeben; er verglich die Amide, den Harnstoff und das Asparagin, welche sich einerseits im Tier-, andererseits im Pflanzenkörper bilden. Dieser Vergleich der Pflanzen- und

¹⁾ *Boussingault*, C. r. 58, 917, 1864.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



EX LIBRIS

Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, M. Bergmann-Dresden, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., K. Doerr-Basel, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, H. Franzen-Karlsruhe i. B., E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. Fürth-Wien, F. Haber-Berlin-Dahlem, M. Hahn-Berlin, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, F. Hayduck-Berlin, E. Hägglund-Abo, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, R. O. Herzog-Berlin-Dahlem, K. Hess-Berlin-Dahlem, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, P. Karrer-Zürich, M. Kochmann-Halle a. S., F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, E. Laqueur-Amsterdam, O. Lemmermann-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, S. Loewe-Dorpat, A. Loewy-Davos, H. Lüers-München, Th. Madsen-Kopenhagen, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Tübingen, L. Michaelis-Nagoya, H. Mollisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, H. Murschhauser-Düsseldorf, W. Nernst-Berlin, C. v. Noorden-Frankfurt a. M., W. Ostwald-Leipzig, J. K. Parnas-Lemberg, Th. Paul-München, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, L. Pincussen-Berlin, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, E. Salkowski-Berlin, T. Sasaki-Tokio, A. Scheunert-Berlin, A. Schlossmann-Düsseldorf, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Basel, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., K. Suto-Kanazawa, U. Suzuki-Tokio, H. v. Tappeiner-München, K. Thomas-Leipzig, H. Thoms-Berlin, E. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, A. v. Wassermann-Berlin, E. Widmark-Lund, W. Wichowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin

herausgegeben von
C. Neuberg-Berlin

Hundertfünfunddreißigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer

1923

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Iwanoff, Nicolaus N. Über die Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen der Fruchtkörper von <i>Lycoperdon</i>	1
Sbarsky, B. Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro	21
Bach, A., B. Sbarsky und K. Nikolajew. Scheinbare auxo- und anti-fermentative Eigenschaften des Serums	32
Bach, A. und W. Engelhardt. Über Antiphenolase (Antilakkase) . .	39
Hagedorn, H. C. und B. Norman Jensen. Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid	46
Sarin, E. Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene . .	59
— — Weitere Studien über Invertase des Darmkanals der Honigbiene	75
Romeis, B. Untersuchungen über die Wirkung des Thyroxins. I. Mitteilung: Über die Wirkung des Thyroxins auf Körpergewicht und Leberglykogen weißer Mäuse	85
Goto, Kiko. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Wärmeregulation der Säugetiere. III. Wärmeregulation der weißen Ratte	107
Spiegel, E. A. und A. Löw. Der Kreatingehalt des Muskels bei anaerobischer Zuckung	122
Smorodinzew, J. A. und A. N. Adowa. Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus. Der Einfluß einiger Chinin- und Harnstoffverbindungen auf die «Proteasen»	128
Palladin, W.† und S. Manskaja. Die Entstehung der Peroxydase in den Pflanzen. Die Bedingungen, welche die Abspaltung der Peroxydase von den Protoplasten und ihren Übergang in den Zellsaft hervorgerufen	142
Gerlóczy, Géza v. und Franz Faludi. Stabilitätskoeffizient der Blutstruktur	158
Nishiguchi, H. Über ein Phänomen bei der Agglutination von Typhusbazillen in salzarmem Medium	165
Waterman, N. und J. Kaff. Über Nitroreduktionen durch lebende Gewebe	174
Orient, Julius. Über ein neues Reagenzglas	182
Franzen, Hartwig und Ernst Keyssner. Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. XXIII. Mitteilung. Kritisches über das Vorkommen der Äpfelsäure in den Pflanzen	183
Hoop, L. de und M. J. van Tussenbroek. Über den Einfluß von Dextrinen auf die Kristallisation von Maltose	217
Straub, H. und Klothilde Meier. Blutgasanalysen. XII. Wirkungen des konstanten und faradischen Stromes auf heterogene Systeme	224
Lieben, Fritz. Über das Verhalten von Brenztraubensäure und Acetaldehyd gegenüber mit Sauerstoff gelüfteter Hefe	240
Heubner, W. und P. Rona. Über den Kalkgehalt der Organe bei kalkbehandelten Katzen	248
Biedermann, W. Die Salzhydrolyse der Stärke	282
Eisler, M. und L. Porthelm. Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweiß-Chlorophylllösungen	293
Hirai, Kinsaburo. Über das Vorkommen von p-Oxybenzaldehyd und p-Oxybenzoesäure bei der bakteriellen Tyrosinzersetzung, mit besonderer Berücksichtigung des dabei gebildeten Melanins	299
Meyer-Bisch, Robert und Paul Thyssen. Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel bei Zuckerkranken. I. Mitteilung	308

IV

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Beckmann, Kurt. Hämolyseversuche in Alkali- und Erdalkalisalzen unter normalen und pathologischen Bedingungen	317
Goto, Kiko. Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins. I.	329
Hári, Paul. Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins. II.	344
Petry, Eugen. Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen. III. Mitteilung. Wirkung von Oxydationsmitteln auf die Empfindlichkeit	353
Franzen, Hartwig und Fritz Helwert. Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. XXIV. Mitteilung. Kritisches über das Vorkommen der Citronensäure in den Pflanzen	384
Eisler, M. Über die Reaktion von Antigen und Antikörper nach Bindung des einen von ihnen an Kohle	416
Umetsu, Kojiro. Beiträge zur Elektroendosmose durch Kohlefilter	442
Borak, Jonas. Über den Einfluß des Säuren- und Basengehalts der Nahrung auf die Zusammensetzung des Harns wachsender Hunde	480
Loll, Wilhelm. Die quantitative Analyse der Knochenasche bei Kriegsosteopathie	493
Sasaki, Takaoki und Ichiro Otsuka. Über die Bildung der rechtsdrehenden β -Furyl- α -milchsäure durch Proteusbakterien	504
Krzywanek, Fr. W. Über die Verwendbarkeit des Zuntz-Geppert-Apparates bei Respirationsversuchen mit kleinen Tieren	506
Rippel, August. Über die Mobilisation der Mineralstoffe und des Stickstoffs aus Holz und Rinde beim frühjährlichen Austreiben	518
Holm, Kurt und A. Bornstein. Über den Einfluß der Schilddrüse auf einige toxische Glykämien	532
Kürten, H. Untersuchungen über die Wirkungsweise von Formaldehyd auf Organkolloide. II. Mitteilung. Formaldehyd und Eiweißquotient	536
Bleyer, B. und H. Schmidt. Studien über das Verhalten der wichtigsten Kohlehydrate (Glucose, Galactose, Fructose, Mannose, Maltose, Lactose, Saccharose) in stark saurer, alkalischer, sulfit- und bisulfithaltiger Lösung. I. Mitteilung. Die Inversion der Lactose mit starken Säuren	546
Meyerhof, O. und H. Weber. Beiträge zu den Oxydationsvorgängen am Kohlemodell	558
Hishikawa, T. Über die Bestimmung zell- und keimschädigender Substanzen auf biologischem Wege. III. Mitteilung. Chinin	576
Blühdorn, Kurt und Grete Genck. Zur Kritik der de Waardschen Mikromethode	581
Tutschku, Karl. Pigmente im Pferdehaar.	585
Haehn, Hugo. Abbau der Stärke durch ein System: Neutralsalze + Aminosäuren + Pepton. (Vorläufige Mitteilung)	587
Morinaka, Kiyoshi. Wirkt Vitaminmangel spezifisch oxydationshemmend?	603
Soda, T. Neue Beobachtungen über die Stimulation der alkoholischen Gärung durch chemisch definierte Körper	611
— — Zur Kenntnis der Glucose-mono-schwefelsäure und Rohrzucker-mono-schwefelsäure. V. Mitteilung	621
Berichtigung	628
Autorenverzeichnis	629

Über die Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen der Fruchtkörper von Lycoperdon.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg.)

(Eingegangen am 1. September 1922.)

Im August 1916 hatte ich folgenden Versuch ausgeführt: Einige frische unverletzte Fruchtkörper des Pilzes Lycoperdon piriforme, an welchen keine Spuren einer Differenzierung des Capillitiums zu bemerken waren, wurden in einen Exsikkator über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur gebracht. Schon nach Verlauf von 3 bis 4 Tagen erhielt man den Eindruck, daß die Fruchtkörperchen reifen; sie waren vertrocknet, schwarz geworden und beim Spalten gaben sie eine Menge Sporen ab. Die Wasserentziehung erwies sich als einer der Faktoren, welche den Reifungsvorgang beschleunigen.

Da ich gerade im Besitz großer Mengen dieser Pilze war, stellte ich mir die Aufgabe, die Umwandlung des Harnstoffs und der stickstoffhaltigen Substanzen während des Reifens derselben zu verfolgen.

Recht bald erwiesen die Versuche, daß das Reifen der Pilze auch dann stattfindet, wenn man die vom Mycel befreiten Fruchtkörperchen während 3 bis 4 Tagen auf Filtrierpapier bei Zimmertemperatur liegen läßt und dann bei 35° C trocknet.

Versuch 1. Es wurden unreife Fruchtkörper von Lycoperdon piriforme gewählt, sorgfältig mit Wasser von fremdartigen Beimengungen gesäubert, mit Filtrierpapier abgetrocknet und dann auf zwei Anteile zu je 1 kg verteilt.

Der Anteil A (Kontrolle) wurde zerkleinert und dann schnell getrocknet, erst bei 35°, zuletzt bei 105° bis zum konstanten Gewicht.

Der Anteil B wurde auf Filtrierpapier während 3 Tagen bei Zimmertemperatur liegen gelassen. Die Zellen der Pilze verloren ihren Turgor. Das allgemeine Aussehen der Pilze wies auf einen deutlich ausgeprägten Reifungsprozeß hin; sie waren schwarz geworden und in ihnen hatte sich das Capillitium mit Sporen ausgebildet; danach wurden die Pilze bei 35° und dann bei 105° bis zum konstanten Gewicht getrocknet.

Der Anteil A (unreif) und der Anteil B (reifend) wurden zu feinem Pulver verrieben.

Es ergaben sich zwischen ihnen folgende Unterschiede:

A (unreif).

1. Aus 1 kg wurden 114 g trockne Substanz erhalten.
2. Gesamtmenge des Stickstoffs 7,12 %.
3. Graues Pulver.
4. Der Alkoholextrakt ist von etwas gelblicher Farbe.
5. Das Pulver wird vom Wasser benetzt.
6. Nach Abwaschen mit Alkohol und Quellen im Wasser bildet es eine schleimartige Masse, welche sich kaum filtrieren läßt (Viskosität).

B (reifend).

1. Aus 1 kg wurden 95 g trockne Substanz erhalten.
2. Gesamtmenge des Stickstoffs 8,74 %.
3. Dunkelbraunes Pulver.
4. Der Alkoholextrakt ist von dunkler Farbe.
5. Das Pulver wird vom Wasser nicht benetzt.
6. Nach Bearbeitung mit Alkohol bildet es keine schleimartige Masse beim Benetzen mit Wasser.

Beim Reifen der Pilze findet eine Abnahme der Trockensubstanz um 19 g (114 bis 95) statt und eine Zunahme des Stickstoffs, dessen Menge von 7,12 % auf 8,74 % gestiegen war.

Da die Abnahme der Trockensubstanz proportional der Zunahme des Stickstoffgehalts ist, so kann man hieraus den Schluß ziehen, daß während des Reifens ein energisches Verbrennen der stickstofffreien Substanz stattfindet¹⁾.

Um dem Einwand vorzubeugen, daß die Gewichtsabnahme durch Einsaugen einiger Mengen Extraktivstoffe ins Filtrierpapier hervorgerufen sein könnte, habe ich einen zweiten Versuch angestellt.

Versuch 2. Zehn große unreife Fruchtkörper von *Lycoperdon saccharatum* wurden der Länge nach in zwei gleiche Teile zerschnitten; jeder Teil hatte ein Rohgewicht von 90 g.

Anteil A (Kontrolle) wurde gleich in kleine Stücke geschnitten und an einem Fädchen erst bei 35°, dann bei 105° getrocknet.

Anteil B: Zehn halbe Fruchtkörper wurden an ein Fädchen gehängt und reiften im Verlauf von 8 Tagen bei Zimmertemperatur; dann wurden sie bei 105° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. In allen Hälften der Fruchtkörper hatte sich eine große Menge Sporen gebildet.

Auf 1 kg Rohgewicht wurde erhalten: Trockengewicht Anteil A 114,4 g; Anteil B 100,0 g.

Diese Gewichtsabnahme scheint in der Hauptsache auf Kosten der Trehalose vor sich zu gehen.

Ich erhielt durch Kochen des feinen Pulvers von unreifen Pilzen mit Alkohol einen Extrakt, welcher beim Stehen große (bis 5 mm) rhombische Kristalle ausschied, die die *Fehlingsche* Flüssigkeit nur nach Hydrolyse mit Säure reduzierten. Der Schmelzpunkt der Kristalle, 100°, entspricht

¹⁾ Bemerkenswert ist die Tatsache einer Zunahme der gesamten Stickstoffmenge beim Reifen: 1 kg unreifer Pilze enthält insgesamt 8,1168 g Stickstoff, während in 1 kg reifender Pilze 8,3030 g vorhanden sind. Das gleiche Resultat wurde in einer ganzen Reihe von Versuchen erhalten; der Grund dieser Erscheinung ist vorläufig noch nicht aufgeklärt.

der Trehalose ($C_{12}H_{22}O_{11} + 2 H_2O$). Bis jetzt ist es mir nicht gelungen, die Trehalose in derselben Weise aus reifenden Pilzen auszuschcheiden.

Im nächsten Versuch verfolgte ich die Gewichtsveränderungen der Trehalose beim Reifen der Pilze.

Versuch 3. Es wurden zwei Anteile unreifer Fruchtkörper von *Lycoperdon piriforme* genommen. Das Reifen fand unter denselben Bedingungen wie im Versuch 1 statt. Die Anteile wurden gepulvert und von dem unreifen Material 7,166 g (5,75 % Gesamt-N), vom reifenden 6,695 g (6,92 % Gesamt-N) entnommen. Beide Anteile wurden im *Soxhletschen* Apparat erst 4 Stunden mit Äther und nach Entfernung desselben zweimal mit Alkohol je 12 Stunden extrahiert; nach dem Erkalten schieden die Alkoholextrakte große rhombische Kristalle aus, deren Menge nach Absaugen und Trocknen im ersten Falle (unreifes Material) 0,6018 g, im zweiten Falle (reifendes Material) 0,0533 g betrug.

Nach dem Umkristallisieren wurden reine Kristalle von Trehalose erzielt, welche auf Grund des Schmelzpunktes (100°) und des Verhaltens zur *Fehlingschen* Flüssigkeit identifiziert wurde.

Dieser Versuch zeigt uns den großen Verbrauch von Trehalose beim Reifen. Hierselbst finden wir auch eine Erklärung dafür, daß die *Trehalose* von *E. Bourquelot* (1891) zuerst *nur in jungen Pilzen* entdeckt worden ist.

Da ich mir die Verfolgung des Schicksals der stickstoffhaltigen Substanzen beim Reifen zur Aufgabe gemacht hatte, so mußte ich zuerst beim Harnstoff verweilen.

Bamberger und *Landsiedl*¹⁾ hatten bei der Untersuchung der *Lycoperdon*-arten zum erstenmal das Vorkommen des Harnstoffs in der Pflanzenwelt entdeckt. Anfangs waren sie der Meinung, daß der Harnstoff aus dem Harn weidender Tiere in die Pilze gelangt war, da die *Lycoperdone* an solchen Stellen gut gedeihen. Da sie aber in den Pilzen keine anderen Elemente des Harns und im Boden selbst keinen Harnstoff vorfanden, so folgerten sie, daß der Harnstoff als Stoffwechselprodukt im Pflanzenkörper erscheint. *Gaze*²⁾ gewann Harnstoff nicht nur aus reifen Exemplaren, wie *Bamberger* und *Landsiedl*, sondern auch aus unreifen *Bovisten* (*Lycoperdon*). Bei *L. cervinum* hatte *Gaze* keine Spuren von Harnstoff erhalten.

Da der *Lycoperdon piriforme*, mit dem ich arbeitete, in betreff des Harnstoffgehalts von früheren Autoren nicht untersucht worden war, so begann ich damit, seine Anwesenheit nachzuweisen. Ohne große Mühe gelang es mir, sein Vorkommen sowohl in unreifen als auch in reifen Pilzen festzustellen. Er wurde mit Alkohol auf dem Wasserbade extrahiert; nach Abdampfen des Alkohols wurde der in Wasser lösliche Teil mit Salpetersäure bearbeitet. Nach mehrtägigem Stehen im Exsikkator schied sich eine dunkelfarbene kristallinische Masse aus. Die Kristalle wurden auf einer Nutsche abgesaugt, in

¹⁾ *M. Bamberger* und *A. Landsiedl*, Monatsh. f. Chem. 24, 218, 1903.

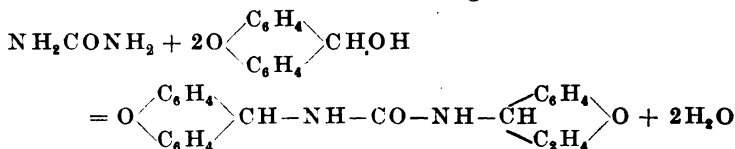
²⁾ *R. Gaze*, Arch. d. Pharm. 243, 78, 1905.

Wasser gelöst und die erhaltene Lösung mit Kohle gekocht. Aus dem farblosen Filtrat schieden sich völlig weiße Blättchen aus. Der Schmelzpunkt (139 bis 140,5°) und andere Eigenschaften derselben wiesen auf salpetersauren Harnstoff hin.

Goris und *Masché*¹⁾ führten eine Reihe von Harnstoffbestimmungen in Pilzen aus und kamen in einigen Fällen zu sehr interessanten Resultaten. So enthielten die reifen Fruchtkörper vom Champignon (*Psalliota campestris*) bis 4,30 % Harnstoff, auf Trockengewicht berechnet, während in den jungen Pilzen dessen Menge bedeutend kleiner war. Als die Autoren dieselbe Art des Pilzes — aber künstlich in der Umgegend von Paris kultiviert — untersuchten, fanden sie in keinem Falle Harnstoff. Die Autoren sind geneigt, diesen Unterschied in der chemischen Zusammensetzung ein und derselben Pilzart dadurch zu erklären, daß die Pilze in den beiden untersuchten Fällen zu zwei benachbarten morphologischen Rassen gehören. In weiteren Versuchen fanden *Goris* und *Masché* keinen Harnstoff selbst in denjenigen Lycoperdonarten vor, in welchen *Bamberger* und *Landsiedl* sein Vorkommen konstatiert hatten. „Nous ne l'avons pas retrouvée non plus dans Lycoperdon Bovista et L. gemmatum Fl., où *Bamberger* et *Landsiedl* l'avaient signalée.“ Obgleich die Autoren den Harnstoff mit einer nicht sehr scharfen Methode bestimmt haben (sie haben ihn als Oxalat ausgeschieden), so ist es doch unzweifelhaft, daß in ein und derselben Pilzart die Harnstoffmenge variieren und selbst bis auf Null heruntergehen kann.

Mir schien es daher sehr wichtig, die Umwandlungen des Harnstoffs beim Reifen der vom Mycel befreiten Lycoperdonexemplare unter den analogen, oben beschriebenen Verhältnissen zu verfolgen. Aber zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs bediente ich mich der Methode von *R. Fosse*²⁾. Alle älteren Bestimmungsmethoden des Harnstoffs besaßen keine große Empfindlichkeit, während die Fällung durch Xanthydrol in 50- bis 70proz. Essigsäurelösung, nach *Fosse*, die Ausscheidung eines kristallinischen Harnstoffderivats ermöglicht, welches leicht in reinem Zustande zu erhalten ist und ein hohes Molekulargewicht (420) hat, während das Molekulargewicht des Harnstoffs nur 60 beträgt.

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Dieses Derivat — Dixanthylharnstoff — läßt sich leicht aus einer mit anderen Substanzen verunreinigten Lösung kristallisieren und identifizieren. Das *Fossesche* Verfahren ermöglicht, den Harnstoff in einer Lösung 1:1000000 zu bestimmen und 0,0001 g Harnstoff auszukristallisieren. Durch Anwendung seines Verfahrens war es *Fosse* gelungen, die allgemeine

¹⁾ *Goris* und *Masché*, C. r. 753, 1082, 1911.

²⁾ *R. Fosse*, C. r. 1912 bis 1913; Ann. de l'Institut Pasteur 30, 1, 1916.

Verbreitung des Harnstoffs in der Tier- und Pflanzenwelt zu konstatieren, obgleich die Mengen desselben oft sehr gering waren; so z. B. erhielt er nach einer Behandlung von 100 Flußkrebsen nur 0,0047 g Harnstoff. Die Anwesenheit von Harnstoff wurde auch bei vielen als Nahrung dienenden Pflanzen, wie Zichorie, Melone, Kürbis, Blumenkohl, Spinat, Mohrrübe, Schnittkohl, Kartoffel und auch bei den Schimmelpilzen *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* festgestellt. Die Menge des von ihm entdeckten Harnstoffs war äußerst gering; so z. B. wurde der Saft von 10 kg Blättern der Gartenzichorie mit Essigsäure in einer Verdünnung von 1:1000 angesäuert, filtriert, im Vakuum auf dem Wasserbade eingedampft und nach Ansäuerung mit Essigsäure bis zu 70 % mit einer alkoholischen Xanthydrolösung (1:10) gefällt; die Menge des so erzielten Niederschlags war sehr gering (der Autor gibt das Gewicht nicht an), und nur der Schmelzpunkt 261° ermöglichte die Feststellung, daß hier das Harnstoffderivat vorlag.

Die Auffindung des Harnstoffs in solchen Mengen erscheint nicht besonders auffallend, da vor seiner Entdeckung in Pilzen von *Kossel* daselbst auch die Anwesenheit von Harnsäurederivaten, wie Xanthin, Adenin und anderen konstatiert worden ist. Nachdem *Bamberger* und *Landsiedl* in den *Lycoperdon*-arten Harnstoff in großen Mengen festgestellt haben und *Fosse* ein äußerst empfindliches Verfahren zur Bestimmung desselben ausgearbeitet hat, so müssen die Pflanzenphysiologen die Bedeutung der Harnstoffbildung in den Pilzen klarstellen und das Schicksal desselben bei der Bildung des Fruchtkörpers verfolgen.

Nachdem ich gefunden hatte, daß die *Lycoperdone* nach ihrer Entfernung vom Mycel in kurzem Zeitraum (s. Versuch 1) unter großer Trockengewichtsabnahme reifen, schien es mir von großer Wichtigkeit zu sein, die Umwandlungen des Harnstoffs während dieses Zeitraums zu verfolgen, und besonders wichtig bei den *Lycoperdon*-arten, bei denen die Harnstoffmenge bis zu 3,5 % des Trockengewichts beträgt. In einer vorläufigen Mitteilung¹⁾ habe ich konstatiert, daß die Mengen des nach *Sachse* bestimmten Amidstickstoffs bei den auf verschiedenen Stufen des Reifens entnommenen *Lycoperdonen* variiert. So fand ich z. B. auf 100 mg Gesamtstickstoff:

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| 1. bei unreifen Exemplaren | 22,5 mg, |
| 2. „ reifenden „ | 27,8 „ |
| 3. „ Sporen | 16,9 „ |

Diese Resultate erzielte ich am Material des Versuchs 1; die Pilze wurden gepulvert, dann 3 Stunden mit 10 % H_2SO_4 hydrolysiert und nach beinahe völliger Neutralisation das Ammoniak im Vakuum nach Zugabe von Calciumoxyd bei 40° abdestilliert.

Eine vergleichende Fällung dieses Materials nach *Stutzer* ergab auf 100 mg Gesamtstickstoff:

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| 1. bei unreifen Exemplaren | 56,4 mg |
| 2. „ reifenden „ | 68,3 „ |
| 3. „ Sporen | 85,4 „ |

¹⁾ *N. Iwanoff*, Journ. de la Société bot. de Russie 2, 129, 1917.

Natürlich besitzen diese Zahlen nur einen vergleichenden Charakter, und auf keinen Fall kann hier eine Rede vom absoluten Gehalt an Eiweißstickstoff in den erwähnten Anteilen sein. Im nachstehenden wurde bei der Harnstoffbestimmung folgendermaßen verfahren: eine abgewogene Menge des gepulverten und bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrockneten Pilzes wurde im *Soxhletschen* Apparat mit Äther extrahiert, dann, nach Entfernung des Äthers, zweimal je 10 Stunden mit Alkohol; nach Entfernung des Alkohols wurde das Material zweimal mit Wasser auf dem Wasserbade extrahiert; in den Extrakten wurde der Harnstoff durch Fällung mit Xanthidrol in 70proz. Essigsäure bestimmt.

Versuch 4. Das Pulver unreifer Exemplare von *Lycoperdon piriforme*, die aber bereits deutliche Anzeichen beginnender Reifung aufwiesen, wurde bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Der Gesamtstickstoff desselben betrug 8,55 % (0,2600 g ergaben 22,23 mg N). Zu dem Versuch wurden 80 g dieses Pulvers verwendet, deren Stickstoffmenge also 6,84 g ausmachte. Der Anteil wurde im *Soxhletschen* Apparat während 10 Stunden mit Äther, 24 Stunden mit Alkohol ohne Erwärmen, dann wieder im *Soxhlet* mit Alkohol 20 Stunden und zuletzt 12 Stunden extrahiert.

Stickstoff wurde extrahiert:

	Extrakt ccm	Stickstoff mg	
1. Alkoholischer	90	77,9	} 936,4
2. „	140	568,5	
3. „	80	280,0	
4. Wässeriger	310	1182,8	} 1558,2
5. „	330	375,2	

In einzelnen Proben von 5 und 10 ccm wurde die Harnstofffällung mit Xanthidrol unter Zugabe von Eisessigsäure bis zu 70 % ausgeführt; der Niederschlag wurde auf einer Nutsche gesammelt, mit Alkohol gewaschen, getrocknet, gewogen, als Dixanthylharnstoff identifiziert und dessen Stickstoffgehalt bestimmt. Die Angaben der einzelnen Proben sind auf den ganzen Anteil umgerechnet.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt:

	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Stickstoff des Harnstoffs mg	Proz. des Harnstoffstickstoffs in bezug auf den Gesamtextrahenten N
1. Alkoholischer	735	48,9	62,8
2. „	4 374	291,3	51,2
3. „	1 700	113,2	40,4
4. Wässeriger	6 809	453,5	48,9
5. „	2 751	183,2	48,9
Im ganzen	16 369	1090,1	

Gesamtstickstoff im Anteil 6,840 g
 Stickstoff mit Alkohol und Wasser extrahiert 2,4846 g
 oder 36,3 %

In 80 g sind enthalten 1,319 g Harnstoff, berechnet auf Trockengewicht 1,65 %.

Versuch 5. Es wurden völlig reife Exemplare von *Lycoperdon piriforme* gewählt. 80 g wurden in derselben Weise wie im vorigen Versuch behandelt.

Auffallend war bei den Pilzen dieser Sammlung der verhältnismäßig geringe Gesamtstickstoffgehalt im Anteil, der im ganzen 6,21 % betrug (0,5270 g gaben 32,5 mg N; 0,4480 g gaben 28,0 mg N).

Extrahierte Stickstoffmenge:

	Extraktionsdauer Std.	Extrakt ccm	N mg
1. Alkoholischer	20	100	171,5
2. „	20	160	145,6
1. u. 2. Wässeriger	—	480	848,5
3. „	—	230	150,9
			317,1
			999,4

In einzelnen Proben zu 5 und 10 ccm wurde die Harnstoffmenge wie im Versuch 4 bestimmt, die Angaben auf den ganzen Anteil von 80 g Trockengewicht und 5,0 g N umgerechnet.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt:

Extrakte	Dixanthylharnstoffniederschlag mg	Stickstoff des Harnstoffs mg	Proz. des Harnstoffstickstoffs in bezug auf den Gesamtextrahenten N
1. Alkoholischer	708	47,2	27,4
2. „	368	24,5	16,8
1. u. 2. Wässeriger	708	47,2	5,6
3. „	—	—	—
Im ganzen	1789	118,9	—

Wenn man die Resultate der Versuche 4 und 5 vergleichen will, so muß bemerkt werden, daß der gesamte Stickstoffgehalt sehr variierte und von der Sammlung der Pilze abhing. Deswegen kann ohne Vorbehalt kein Vergleich zwischen diesen beiden Versuchen stattfinden, aber als zweifellose Tatsache ergibt sich eine große Harnstoffabnahme bei reifen Pilzen im Vergleich zu denen, die erst zu reifen beginnen.

80 g unreifer ergaben 1090,1 mg Harnstoffstickstoff

80 g reifer „ 118,9 mg „

Noch ein Resultat dieser Versuche muß an dieser Stelle angeführt werden, nämlich die Schwierigkeit der Harnstoffextraktion mit Alkohol; trotz der allgemein gut bekannten Löslichkeit in Alkohol läßt sich der Harnstoff aus den Pilzen im *Soxhlet*schen Apparat nur schwer extrahieren. Nach einer Extraktionsdauer von 56 Stunden im Versuch 4 betrug der Auszug nur 453,4 mg (auf N berechnet), während nach ergänzender Extraktion mit Wasser 636,7 mg Harnstoffstickstoff ausgeschieden wurden. Hieraus folgt zweifellos, daß der Harnstoff in den

Pilzen nicht in freiem Zustande enthalten ist, sondern mit anderen Verbindungen in irgend einer chemischen, vermutlich sehr labilen Bindung vorliegt, da schon eine zweimalige Behandlung mit heißem Wasser die Lösung dieser Bindung bewirkt.

In den nachstehenden Versuchen bediente ich mich der Pilze ein und derselben Sammlung, um gut vergleichbare Resultate zu erhalten.

Versuch 6. Zwei Portionen kleiner Fruchtkörper von *Lycoperdon piriforme* ein und desselben Alters, an ein und derselben Stelle gesammelt, wurden in zwei Anteile zu je 190 g Rohgewicht geteilt.

Anteil A wurde zerkleinert, schnell ausgetrocknet, erst bei 30°, dann bei 110°; beim Pulverisieren waren keine Sporen zu bemerken, die Farbe war weiß.

Anteil B (unzerkleinerte Fruchtkörper) wurden 7 Tage lang auf Papier der Reifung überlassen, dann getrocknet, anfangs bei 30°, zuletzt bei 110°; die Pilze waren völlig reif geworden; es hatten sich Sporen gebildet; das Pulver war dunkelgrün.

Die gesamte Stickstoffmenge nach *Kjeldahl*:

Anteil A 5,75 % N (0,4487 g ergaben 25,82 mg N).

„ B 6,92 % N (0,3956 g „ 27,39 mg N).

Zum Versuch wurde dann Pulver entnommen:

A (unreife) 7,1660 g mit 412,1 mg Gesamtstickstoffgehalt,

B (reifend) 6,6950 g „ 503,3 mg „

Um einen bequemen Vergleich zu erzielen, wurden die erhaltenen Resultate auf 503,3 mg N berechnet, d. h. alle für den Anteil A erhaltenen Zahlen wurden mit 1,221 multipliziert (503,3 : 412,1).

Die Pulver beider Anteile wurden einer Extraktion im *Sorleth*schen Apparat unterworfen.

1. Mit Äther 4 Stunden, dann nach Entfernung des Äthers
2. mit Alkohol 11 Stunden und von neuem
3. mit Alkohol 12 Stunden und nach Entfernung des Alkohols dreimal mit kochendem Wasser auf dem Wasserbade.

In einzelnen Proben der Extrakte wurde der gesamte Stickstoffgehalt bestimmt.

Die Menge des gesamten N in Milligrammen:

Extrakte	Anteil A	Anteil B
1. Alkoholischer	61,6	84,0
2. „	19,4	14,0
1. Wässriger	51,7	47,7
2. u. 3. „	17,0	9,3
Im ganzen	149,7	155,0

Der Harnstoff wurde in einzelnen Proben der Extrakte, welche mit Essigsäure bis auf 70 % angesäuert waren, durch Einwirkung einer 10proz. alkoholischen Xanthydrolösung gefällt.

Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt:

Extrakte	A unreife		B reife	
	Dixanthylharnstoff mg	N des Harnstoffs mg	Dixanthylharnstoff mg	N des Harnstoffs mg
1. Alkoholischer	0	0	408,0	27,2
2. „	0	0	Spuren	Spuren
1. Wässeriger	274,3	18,3	182,2	12,1
2 u. 3. „	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Im ganzen	274,3	18,3	592,2	39,3

Der Dixanthylharnstoffniederschlag wurde einer Stickstoffanalyse unterzogen.

0,2000 g ergaben 13,20 mg N, d. h. 6,60 % N; theoretisch 6,66 % N.

Auffallend ist der geringe Harnstoffgehalt in den Pilzen dieser Sammlung, aber wenn man die Harnstoffmengen der Anteile A und B vergleicht, so müssen wir konstatieren, daß die Menge desselben während des Reifens stark zugenommen hat.

Der Dixanthylharnstoffniederschlag betrug: im Anteil A 274,3 mg, im Anteil B 592,2 mg.

In diesem Falle überrascht die Unmöglichkeit, den Harnstoff im Anteil A mit Alkohol zu extrahieren und die schwierige Extrahierbarkeit im Anteil B. Ein 23stündiges Extrahieren mit Alkohol im *Soxhlet*'schen Apparat ergab keine Spuren von Harnstoff, während durch die nachfolgende Behandlung mit heißem Wasser 274,3 mg Dixanthylharnstoff gewonnen wurden. Es ist klar, daß hier der Harnstoff nicht als solcher, sondern in labiler Verbindung mit anderen Substanzen vorliegt. Es war nötig, die Menge des Amidstickstoffs nach *Sachse* zu bestimmen, um eine Möglichkeit zur Beurteilung der Entstehungsquellen des Harnstoffs zu erhalten.

Die Portionen A und B wurden 3 Stunden mit 10 % H_2SO_4 gekocht, dann die ganze Masse nahezu neutralisiert und das Ammoniak nach Zugabe von Calciumoxyd bei 40° und 15 mm Druck abdestilliert.

A: 0,8725 g mit 50,17 mg Gesamt-N ergaben 3,27 mg Ammoniak-N

B: 1,7935 g „ 124,1 mg „ „ 10,13 mg „

Durch Umrechnung auf eine Portion von 503,3 mg N ergibt A 32,8 mg, B 41,1 mg Amidstickstoff.

Somit hatte die Menge des Amidstickstoffs beim Reifen zugenommen, und trotz der verhältnismäßig großen Menge Amidstickstoff in der Portion A, nämlich 32,8 mg, wurden nur 18,3 mg Harnstoffstickstoff daselbst erhalten. Wahrscheinlich geht der Harnstoffbildung die irgend einer labilen Stickstoffverbindung voraus, die beim Kochen mit 10 % H_2SO_4 Ammoniak liefert.

Im Alkoholextrakt der Portion A wurde kein Harnstoff festgestellt; deswegen wurde in den alkoholischen Extrakten beider Portionen der Stickstoff nach *Sachse* bestimmt; in einzelnen Proben wurde der Alkohol durch Destillation entfernt und nach dreistündigem Kochen mit 10 % H_2SO_4 das Ammoniak nach Zugabe von Calciumoxyd bei 40° und 15 mm Druck abdestilliert.

	N in der Probe mg	Amid-N in der Probe mg	Amid-N in dem gesamt. alk. Extrakte der Portion mg
A	10,29	1,96	15,5
B	18,66	3,49	18,3

Im Alkoholextrakt wurde ebenso eine Zunahme der Amidstickstoffmenge beim Reifen der Pilze festgestellt. Trotz des Fehlens von Harnstoff im Alkoholextrakt der Portion A ist in demselben doch irgend eine labile Substanz vorhanden, die bei dem Verfahren von *Sachse* Stickstoff ausscheidet.

Versuch 7. Wiederholung des vorigen. Fruchtkörper aus einer neuen Sammlung. Portionen A und B zu je 200 g Rohgewicht.

Aus 200 g Trockengewicht (getrocknet bei 110° C) ergab sich:

A (unreife): 23,23 g mit 3,49 % Gesamtstickstoff

B (reifende): 21,40 g „ 4,19 % „

Aus 1 kg Rohgewicht wurden erhalten:

In Portion A 116,4 g Trockengewicht.

„ „ B 107,0 g „

Somit ergab sich beim Reifen ein sehr großer Verbrauch der stickstofffreien Substanz. Auffallend ist der geringe Gehalt an Gesamtstickstoff im Vergleich zu den Angaben anderer Versuche. Darum können nur parallele Portionen von ein und derselben Sammlung als Material zur Betrachtung der Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen dienen.

In diesen Portionen wurde die Menge des Ammoniak- und des Amidstickstoffs bestimmt. Die zu 2 g abgewogenen trockenen Pulver jeder Portion wurden nach Zugabe von Wasser und Calciumoxyd bei 40° und 15 mm destilliert, in einigen Fällen unmittelbar (Stickstoff der ammoniakalischen Salze), in anderen nach vorhergehendem dreistündigen Kochen mit 10 % H_2SO_4 (Amidstickstoff).

2 g Ausgangsmaterial ergaben:

	Ammoniak-N mg	Amid-N mg
Portion A	1,09	5,01
„ B	1,74	5,23

Dann wurden die abgewogenen Substanzmengen der Portionen A, 16,44 g, und B, 13,70 g, mit 574 mg Gesamtstickstoffgehalt der gewöhnlichen Extraktion im *Soxhlet*schen Apparat mit Äther, zweimal mit Alkohol und dreimal mit kochendem Wasser unterzogen.

Im ganzen ergab sich extrahierter Stickstoff:

Extrakte	Portion A mg	Portion B mg
Alkoholische	97,5	64,8
Wässerige	57,4	36,6
Im ganzen	154,9	101,4

Die Harnstoffbestimmung ergab folgende Resultate.

Dixanthylharnstoffniederschlag in den Extrakten:

	A unreife mg	B reife mg
Alkoholische	0	37,2
Wässrige	Spuren	Spuren

In der unreifen Portion waren nur Spuren von Harnstoff aufzufinden, während in der reifenden wägbare Mengen vorhanden waren.

Ich bestimmte auch die Amidstickstoffmenge in den alkoholischen Extrakten.

Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt.

Für die Portionen A und B mit 57,4 mg Gesamtstickstoffgehalt:

	Amid-N in der Portion mg	Amid-N in dem alk. Auszug mg	Harnstoff-N in dem alk. Auszug mg
A	41,1	11,8	0
B	35,8	6,8	2,48

Trotz der großen Menge des nach *Sachse* bestimmbaren Stickstoffs fand sich in der Portion der unreifen Pilze kein Harnstoff. Somit beträgt die Harnstoffmenge in unreifen Pilzen manchmal Null, manchmal eine bestimmte Größe, aber stets eine geringere als bei reifenden Pilzen, wie aus den Versuchen 6 und 7 zu ersehen ist. Aber bei völlig reifen Pilzen sinkt die Harnstoffmenge wieder und verschwindet ganz in den Sporen. Diese Tatsachen illustriere ich noch durch zwei Versuche.

Versuch 8. Vier große unreife Fruchtkörper *Lycoperdon saccatum* von einem Gewicht von 160 g wurden der Länge nach in zwei Hälften zerschnitten; so gelangte man zu zwei völlig gleichen Portionen von je 80 g Rohgewicht mit 734,1 mg Gesamtstickstoffgehalt.

Portion A wurde zerschnitten, schnell getrocknet, erst bei 30°, dann bei 110°; das Pulver war von etwas dunkler Färbung, Sporen waren nicht zu ermitteln.

Portion B wurde bis zum völligen Reifen 10 Tage auf Papier liegen gelassen, wonach sich eine Menge Sporen gebildet hatte; die Farbe des Pulvers war dunkelgrün.

Es wurde die Menge des gesamten Stickstoffs bestimmt.

Portion A: 0,3007 g	ergaben 28,70 mg N = 9,54 %	} 9,47 % N.
0,2103 g	„ 19,78 mg N = 9,40 %	
„ B: 0,2832 g	ergaben 28,35 mg N = 10,01 %	} 9,99 % N.
0,2547 g	„ 25,38 mg N = 9,96 %	

Entnommen wurde vom Pulver der Portion

A: 6,2873 g mit 595,4 mg N,

B: 5,5169 g „ 551,6 mg N.

Wie üblich, wurde mit Äther, Alkohol und Wasser extrahiert; in den Extrakten wurde der Gesamt- und der Harnstoffstickstoff bestimmt. Zur Bequemlichkeit wurden die Resultate des Versuchs auf den Gesamtstickstoff der Hälften, d. h. auf 734,1 mg umgerechnet.

Die Stickstoffmenge der Extrakte in Milligrammen:

	A unreife mg	B reife mg
1. Alkoholischer	150,9	185,9
2. „	28,3	9,7
1. Wässeriger	53,8	52,2
2. u. 3. „	25,3	11,6
Im ganzen	258,3	259,4

Die Harnstoffmenge:

	A unreife		B reife	
	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff N mg	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff N mg
1. Alkoholischer	551,5	36,7	932,1	62,1
2. „	34,6	2,3	21,3	1,4
1. Wässeriger	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
2. u. 3. „	—	—	—	—
Im ganzen	586,1	39,0	953,4	63,5

Die Stickstoffmenge des Harnstoffs war von 39,0 mg in den unreifen Hälften bis auf 63,5 mg in den reifenden Hälften gestiegen. Von Interesse war, daß die Sporen in der Portion B sich *innerhalb* der Hälften des Fruchtkörpers gebildet hatten, aber an der Schnittfläche fehlten sie vollständig; das Gewebe blieb von außen weiß und bedeckte die Sporen von dunkler Farbe¹⁾.

Noch einen Versuch mit vollständig reifen Pilzen führe ich hier an.

Versuch 9. Sieben große Exemplare vollständig reifer Fruchtkörper von *Lycoperdon saccharum* wurden getrocknet, in kleinere Stücke zerschnitten, der Stiel des Pilzes vom oberen Teile, dem Capillitium, getrennt; aus dem letzteren wurden die Sporen ausgeschüttelt, das Capillitium und der Stiel des Pilzes wurden pulverisiert.

Es ergab sich im ganzen Trockensubstanz:

Sporen	23,42 g
Capillitium	6,20 g
Stiel	5,60 g

Im ganzen . . 35,22 g

d. h. das Gewicht der Sporen im Fruchtkörper beträgt 69 % des Gesamtgewichts des ganzen Pilzes.

Eine große Portion Sporen von 13,5 g wurde einer Extraktion mit Äther, Alkohol und Wasser unter den oben genannten Verhältnissen unter-

¹⁾ Außerdem wurden zu je 0,52 g Ausgangsmaterial beider Anteile genommen und der Harnstoff *nur mit Wasser* extrahiert.

	A	B
Dixanthylharnstoffniederschlag .	42,0 mg	82,0 mg
Harnstoffstickstoff	2,8 „	5,5 „
Harnstoff	6,0 „	11,7 „
Harnstoff, ber. auf Trockengewicht (0,52 g)	1,15 %	2,25 %

zogen. Ebenso wurde mit dem Capillitium verfahren. In allen Extrakten wurde versucht, den Harnstoff nach *Fosse* zu bestimmen, aber die Resultate fielen völlig negativ aus, mit Ausnahme des wässerigen Extrakts aus dem Capillitium, in welchem ein geringer Dixanthylniederschlag, etwa gegen 6 mg, erhalten wurde.

Hieraus folgt, daß die Harnstoffmenge beim Reifen zunimmt (Versuch 8) und in den Sporen verschwindet (Versuch 9). Es erregt die Aufmerksamkeit auch die Tatsache, daß in den Sporen die Menge des mit Alkohol und Wasser extrahierbaren Stickstoffs in bedeutendem Grade abnimmt. So wurde im Versuch 8 aus reifenden Pilzen (einer Portion von 734,1 mg N) extrahiert:

mit Alkohol . . .	195,6 mg N oder 26,7 % N
„ Wasser . . .	63,8 mg N „ 8,7 % N
im ganzen . . .	259,4 mg N oder 35,4 % N

Aus den Sporen im Versuch 9 (Portion von 1000,4 mg N):

extrahiert mit Alkohol . .	40,9 mg N oder 4,1 % N
„ „ Wasser . .	10,4 mg N „ 1,0 % N
im ganzen .	51,3 mg N oder 5,1 % N

Die Abnahme des extrahierbaren Stickstoffs von 35,4 bis auf 5,1 % weist darauf hin, daß beim Reifen die löslichen Stickstoffprodukte des Capillitium in Verbindungen übergehen, welche in Alkohol und Wasser unlöslich sind und sich in den Sporen ablagern. Zu dieser Erkenntnis kam ich schon 1917¹⁾, als ich die Mengen des extrahierbaren Stickstoffs in verschiedenem physiologischen Zustande bestimmte.

Ich erhielt, auf eine Portion von 100,0 mg umgerechnet, in den Extrakten Stickstoff in Milligrammen:

Unreife:	Alkoholischer . . .	19,0	} 38,1
	Wässeriger . . .	19,1	
Reifende:	Alkoholischer . . .	19,1	} 32,1
mit Sporen:	Wässeriger . . .	13,0	

Nach Ausschütteln der Sporen aus dem Fruchtkörper von reifenden Pilzen ergab sich:

Capillitium:	Alkoholischer . . .	28,5	} 45,1
	Wässeriger . . .	16,6	
Sporen:	Alkoholischer . . .	10,1	} 17,1
	Wässeriger . . .	7,0	

Im gegebenen Falle wurde nach *Sachse* die Menge des Amidstickstoffs bestimmt.

Wenn man die Menge des gesamten Stickstoffs in der Portion zu 100 annimmt, so erhalten wir Stickstoff nach *Sachse*:

Unreife.	22,5 mg
Reifende	27,8 mg
Sporen	7,3 mg

Hieraus sehen wir, daß die Menge der löslichen Stickstoffverbindungen, des Stickstoffs nach *Sachse*, wie auch die Menge des Harnstoffs in den Sporen stark abnimmt und im letzten Falle bis auf Null sinkt.

¹⁾ N. Iwanoff, l. c.

Welche Rolle spielt der Harnstoff in der Pflanze und wie ist seine Bildung und Umwandlung beim Reifen der Pilze zu erklären?

In der Literatur finden wir nur lückenhafte Meinungen über diesen Gegenstand. *Bamberger* und *Landsiedl*, *Goris* und *Mascré*, *Fosse* warfen die Frage über die Harnstoffentstehung in den Pflanzen auf. Die Annahme, daß seine Anwesenheit mit Resten von tierischen Exkrementen verbunden sei, mußte fallen, wenn vom Pflanzenmaterial sorgfältig alle möglichen Verunreinigungen abgewaschen worden waren. Als endgültig in dieser Frage gelten die Angaben von *Fosse*, welcher bewies, daß *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum*, in sterilen Verhältnissen aufgewachsen, Harnstoff bilden, und daß in den Keimlingen der Erbse mehr Harnstoff enthalten ist als in den Samen. Nach diesen Versuchen erscheint der Harnstoff als ein physiologisches Produkt der Pflanzenzelle¹⁾. *Goris* und *Mascré*, welche den Harnstoff bei verschiedenen Pilzen vorfanden, konnten die Frage noch nicht beantworten, ob sich der Harnstoff während des Prozesses einer normalen Ernährung oder während des Trocknens bildet.

Ich führe noch einen meiner Versuche an, der eine Antwort auf diese Frage geben wird.

Versuch 10. 200 g junge *Lycoperdon piriforme* wurden der Länge nach in zwei Anteile zerschnitten. Anteil A = 100 g; die Pilze wurden in Stücke zerschnitten und trockneten auf Filtrierpapier.

Anteil B = 100 g wurde 7½ Monate in 150 ccm Alkohol aufbewahrt. Nach Verlauf dieses Zeitraums wurde die ganze Pilzmasse im Mörtel zerrieben, auf einer Nutsche abgesaugt und mit Alkohol gewaschen.

Beide Portionen wurden zerkleinert und dann einer Extraktion mit Alkohol im *Soxhlet*schen Apparat und zuletzt mit Wasser unterzogen. In den Extrakten wurde die Menge des Gesamtstickstoffs und des Harnstoffs bestimmt.

Der extrahierte Stickstoff betrug im

	A an der Luft mg	B in Alkohol mg
1. Alkoholischen Extrakt . . .	112,6	245,9
2. " " " . . .	31,2	58,9
3. Wässerigen " " " . . .	91,6	46,9
Im ganzen	235,4	351,7

In einzelnen Proben wurde Harnstoff bestimmt, dessen Menge sich in beiden Anteilen als beinahe gleich erwies:

Extrakte	A an der Luft		B in Alkohol	
	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff- stickstoff mg	Dixanthyl- harnstoff- niederschlag mg	Harnstoff- stickstoff mg
1. Alkoholische	120,0	8,0	221,0	14,6
2. Wässerige	339,6	21,8	138,0	9,1
Im ganzen	459,6	29,8	359,0	23,7

¹⁾ Le végétal est, comme l'animal, capable de créer l'urée, *Fosse*, l. c., 1916.

In der getrockneten und in der in Alkohol konservierten Portion erwies sich die Harnstoffmenge ziemlich gleich; die geringe Abnahme in der Portion B (alkoholische) kann dadurch erklärt werden, daß die Urease eine Spaltung des Harnstoffs hervorgerufen hat, da 62proz. Alkohol (bei Annahme eines Wassergehaltes in frischen Pilzen gegen 90%) natürlich die Arbeit der Fermente nicht unterbindet, wie aus den zahlreichen Arbeiten *Bourquelots*¹⁾ und seiner Schule hervorgeht. Durch Einwirkung spaltender Fermente kann man also die schlechte Übereinstimmung der Mengen des mit Alkohol und Wasser extrahierbaren Stickstoffs in beiden Portionen erklären. Der große Überschuß von 351,7 mg in der Alkoholportion im Vergleich zu 235,4 mg in der Luftportion, ergibt sich nach meinen vorläufigen Versuchen aus der Bildung von Glucosaminderivaten aus Chitin und Pilzschleimmasse [das Viscosin früherer Autoren²⁾].

Nachdem gezeigt worden ist, daß die Pflanzenzelle imstande ist, Harnstoff zu erzeugen, verliert die Erklärung von *Fosse*, daß der Harnstoff aus dem Boden geschöpft werden könne, „soit partiellement, soit en totalité à la terre végétale, où l'urée existe et se forme d'après nos nombreuses expériences“, beträchtlich an Gewicht, obgleich der Harnstoff in Anbetracht seiner leichten Löslichkeit und schnellen Wanderung durch Membranen ohne vorherigen Zerfall durch die Zellen der Wurzel in die Gewebe der Pflanzen geraten könnte.

Solcher Ansicht ist *Weyland*³⁾, welcher zahlreiche mykotrophische Pflanzen auf ihren Harnstoffgehalt untersucht hat. In den meisten Fällen enthielten die obligaten Mykotrophen und alle vom Autor untersuchten Orchideen Harnstoff. Bei den echten Autotrophen fand der Autor meistens nur ammoniakalische Salze, aber keinen Harnstoff vor. Dort aber, wo derselbe konstatiert wurde (bei einigen Schachthalmen (*Equisetum*) und Farnen auf sumpfigem Boden), erklärt der Autor dessen Anwesenheit dadurch, daß diese Pflanzen den Harnstoff (oder Substanzen, aus welchen derselbe abgespalten wird) aus dem Boden aufnehmen.

Wir lassen die Fälle, in denen eine Einwanderung des Harnstoffs in die Pflanze von außen in Frage kommt, beiseite und wenden uns zur Harnstoffbildung in der Pflanze selbst. Literaturangaben auf diesem Gebiete fehlen fast gänzlich. Aber über die Frage der Harnstoffbildung in der Pflanze besitzen wir doch reichliches Material. Schon *Pasteur*⁴⁾ hatte gezeigt, daß der Zerfall des Harnstoffs bei ammoniakalischer Gärung mit der Tätigkeit bestimmter Bakterien verbunden ist. Sogar vor Entdeckung des Harnstoffs in der Pflanze hatte *Semal*⁵⁾ auf die Anwesenheit von Urease

¹⁾ *E. Bourquelot*, Journ. de pharm. et de chim. 1912—1917.

²⁾ Viscosin spaltet sich nach meinen Untersuchungen, die ich in nächster Zeit zu veröffentlichen beabsichtige, in Glucosamin + Phosphorsäure.

³⁾ *H. Weyland*, Jahrb. f. wiss. Bot. 51, 1, 1912.

⁴⁾ *Pasteur*, C. r. 50, 819, 1860.

⁵⁾ *O. Semal*, Ann. d. pharm. 4, 279.

in Pilzen hingewiesen. Auf die Untersuchungen von *Shibata*¹⁾, welcher die Urease im Mycel des *Aspergillus niger* vorfand, folgt eine ganze Reihe von Arbeiten. *Takeuchi*²⁾ fand die Urease in dem Samen der Sojabohne vor. *Kiesel*³⁾ und eine Reihe anderer Autoren wiesen auf die große Verbreitung der Urease in der Pflanzenwelt hin. Die Autoren beurteilten die Tätigkeit der Urease auf Grund der Ammoniakbildung nach Harnstoffzugabe von außen. *Kiesel*⁴⁾, welcher eine große Zahl Pflanzenobjekte auf ihren Ureasegehalt untersuchte, konnte nur bei sehr wenigen Pflanzen (innere Zwiebelschuppen, Wurzel von *Beta vulgaris* und *Daucus Carota*, alle Organe der Kartoffel und *Pelargonium*) das Fehlen dieses Ferments nachweisen, aber selbst hier kann man den Einwand machen, daß eine kleine Menge Ammoniak nicht übergehen konnte, da das Medium Zucker enthielt. Die fast allgemeine Verbreitung der Urease in den Pflanzen steht nach den Versuchen von *Fosse*⁵⁾ vollständig im Einklang mit dem Vorkommen des Harnstoffs, ja selbst die Mengen des Harnstoffs und des denselben spaltenden Ferments stehen in einem bestimmten Verhältnis zueinander. *Fosse* fand in den ruhenden Samen der Erbse nur Spuren von Harnstoff (auf 1 kg Samen weniger als 0,01 g), während dessen Menge in einmonatlichen Keimlingen bedeutend zunahm (auf 1 kg Keimlinge 0,64 g Harnstoff). In den Versuchen *Kiesels*⁴⁾ war in ruhenden Samen von *Vicia sativa* die Urease wenig aktiv: von 0,5 g Harnstoff zerfielen nur 0,0116 g; aber als zum Versuch zehntägige Samenlappen derselben Pflanze genommen wurden, wurde im analogen Falle um 11mal mehr (0,130 g) Harnstoff zersetzt; dieselben Samenlappen zeigten, nachdem sie die vorrätigen Substanzen im Verlauf von 28 Tagen verbraucht, wieder eine Abnahme der Urease (0,0100 g Harnstoff wurden zersetzt). Charakteristisch ist, daß bei diesen Versuchen die Menge der Urease in den Blättern zehnmal mehr beträgt als in den Wurzeln und 20mal mehr als in den Stengeln. *Fosse* hat das Verzeichnis der Urease enthaltenden Pflanzen bedeutend vergrößert. Er hat festgestellt, daß die gleichzeitige Anwesenheit des Harnstoffs und der Urease von tiefer physiologischer Bedeutung ist.

Nach *Fosse* ist der Harnstoff für die Ernährung der Pflanzen ebensowenig wie für die der Tiere geeignet. „L'urée est un produit d'excrétion des végétaux comme des animaux.“ In diesem Falle besteht die Rolle der Urease darin, daß sie einen zur Assimilation unfähigen Körper in zwei Nährstoffe — Ammoniak und Kohlensäure — verwandelt. Würde die Urease fehlen, so würden die Pflanzen Stickstoff in Form von Harnstoff ausscheiden, wie es bei den Tieren der Fall ist. Bei Beurteilung der Rolle der Urease hat der Autor einen Umstand außer acht gelassen. Wir wissen, daß das in den Pflanzen weit verbreitete Ferment Arginase eine Spaltung des Arginins in Ornithin und Harnstoff hervorruft, wir haben alle Ursache anzunehmen, daß in

¹⁾ K. Shibata, Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol. 5, 388, 1904.

²⁾ T. Takeuchi, Jour. Coll. Agric. Tokyo 1, 1, 1909.

³⁾ A. Kiesel, Zeitschr. f. phys. Chem. 75, 169, 1911; 118, 247—300, 1922.

⁴⁾ A. Kiesel, l. c., p. 247, 1922.

⁵⁾ Fosse, l. c., 1916.

der lebenden Pflanze dieses Ferment diese Reaktion in umgekehrter Richtung ausführt, und daß der Harnstoff bei der Synthese des Arginins ganz eintreten kann; dieselbe Rolle kann der Harnstoff in den Pflanzen bei der Bildung der Purinbasen spielen. Hier liegen die Gründe, warum die Behauptung von *Fosse*, daß ein ganzes Molekül des Harnstoffs ohne vorherigen Zerfall zur Ernährung nicht ausgenutzt werden könne, nicht angenommen werden kann. Es ist nicht außer acht zu lassen, daß in den meisten Fällen die Menge des in den Pflanzen auftretenden Harnstoffs sehr gering ist und völlig gedeckt wird von der Menge, die im Molekül des Arginins enthalten ist, und daß einzig der reiche Harnstoffgehalt bei einigen Pilzen (*Lycoperdon*, *Champignon*), welcher die Bedürfnisse des Arginin- und Purinbasenaufbaues bedeutend übertrifft, der Fall sein kann, auf welchen die Erwägungen von *Fosse* anwendbar sind.

Was den Mechanismus des Harnstoffzerfalls in der Pflanze anbetrifft, so kann man sich ohne Schwierigkeiten den Verlauf der Reaktion in folgendem Sinne darstellen:



aber der Mechanismus der Harnstoffsynthese aus Ammoniak und Kohlensäure ist uns nicht klar. Wir besitzen kein experimentelles Material, welches auf die Reversibilität der oben bezeichneten Reaktion hinwiese.

Die Angaben von *Kiesel* (1911), welcher zeigte, daß der Harnstoffzerfall durch Urease der Weizenkeime bis zu 91,66 % beträgt und diejenigen von *Marshall*¹⁾, daß dieser Zerfall 98 % erreicht, wenn man das Ferment der Sojabohnensamen nimmt, und daß die Zerfallsreaktion nie bis zu Ende verläuft, sprechen für die Möglichkeit einer Umkehrbarkeit des fermentativen Prozesses. Aber die experimentelle Prüfung der synthetischen Wirksamkeit der Urease, die von *Wakeman* und *Dakin*²⁾ mit der Leber, und von *Kiesel* (1916) mit Pflanzenobjekten unternommen worden war, führte zu negativen Resultaten. Da die Auffindung der Bedingungen, unter denen das Ferment die inverse Reaktion bewirkt, eine sehr schwierige Sache ist, die Möglichkeit einer solchen Entdeckung aber nicht ausgeschlossen ist, so bleibt diese Frage gegenwärtig ungelöst.

Wie vollzieht sich die Synthese des Harnstoffs im Tierkörper?

Die anfänglichen Vermutungen (*Dumas et Cahours*, 1842), daß der Harnstoff durch Isomerisation des Ammoniumcyanats entstehe, wie bei *Wöhler*, fallen fort, da sie keine experimentelle Bestätigung fanden. *E. Abderhalden*³⁾ bestätigt ebenso bei der Berührung der Frage über die Harnstoffentstehung im tierischen Organismus: „es ist auch nicht gelungen, im Organismus Cyansäure aufzufinden“. Nach *A. Bechamp*⁴⁾, welchem es

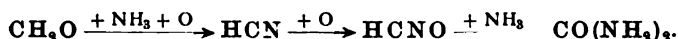
¹⁾ *E. Marshall*, Journ. biol. chem. 14, 283, 1913; 15, 495, 1913.

²⁾ *A. Wakeman* und *H. Dakin*, Journ. biol. chem. 9, 327, 1911.

³⁾ *E. Abderhalden*, Lehrbuch, S. 320. 1909.

⁴⁾ *A. Bechamp*, C. r. 43, 548, 1856.

gelang, Harnstoff aus Eiweißstoffen durch Oxydation mit Kaliumpermanganat zu erhalten und nach *Hofmeister*¹⁾, welcher gezeigt hat, daß viele stickstoffhaltige und stickstofffreie Substanzen durch Oxydation in Gegenwart von Ammoniak Harnstoff liefern, befaßte sich *Fosse* mit dieser Frage. Mit Hilfe seines empfindlichen Verfahrens zur Harnstoffbestimmung zeigte er, daß viele Kohlehydrate, Glycerin und Formaldehyd als C-Quellen für die Harnstoffsynthese dienen können, wenn man sie in Gegenwart von Ammoniak und Permanganat oxydiert. Diese Reaktion wurde von *Fosse* genau untersucht, im Verlauf derselben wurden intermediäre Substanzen aufgefunden, unter welchen Cyansäure nachgewiesen und ausgetrennt wurde²⁾. Der Autor gibt ein genaues Verfahren zur Ausscheidung derselben in Form des Silbersalzes an. Die große Harnstoffausbeute bei Verwendung des Formaldehyds (auf 100 Teile Formaldehyd werden durch Erwärmen mit Ammoniumsalzen 140 Teile Harnstoff erzielt), führte den Autor zu der Hypothese, daß bei künstlicher Oxydation der Kohlehydrate in Gegenwart von Ammoniak diese Substanz ein Vorläufer des Harnstoffs sei. Zwischen dem Formaldehyd, welcher als Assimilationsprodukt erscheint und als Ausgangsmaterial bei der Synthese des Harnstoffs vom Autor angenommen wird, und der HCNO, welche derselbe bei künstlicher Oxydation organischer Substanzen entdeckt hat, soll, nach seiner Ansicht, noch eine des öfteren in Pflanzen nachgewiesene Substanz, die Blausäure, HCN, eingeschaltet werden. Der Prozeß der Harnstoffbildung durch Oxydation läßt sich also nach *Fosse* durch folgendes Schema veranschaulichen:



Solange keine experimentellen Angaben, welche die Anwesenheit der Cyansäure im Organismus belegen, beigebracht werden, kann dieses Schema nicht angenommen werden. Was aber die oxydative Bildung des Harnstoffs anbetrifft, so können die Erwägungen von *Fosse* in bezug auf die Analogie der Harnstoffbildung bei seinen Oxydations-synthesen und in lebenden Organismen, durch die Ergebnisse meiner Versuche über die Harnstoffbildung bei der Reife der Lycoperdonen gestützt werden. Tatsächlich nimmt beim Reifen der Pilze die Atmung sehr stark zu, weiter findet eine bedeutende Erwärmung der Fruchtkörper statt, die Menge der Trockensubstanz — 114 g (Versuch 1) — in unreifen Pilzen sinkt beim Reifen bis auf 95 g, es ergibt sich eine Abnahme von 16,7 % Trockengewicht. Diese Angaben weisen auf einen lebhaften Oxydationsprozeß beim Reifen hin; parallel damit findet eine Anreicherung des Harnstoffs, welcher als Zwischenglied im Gang der Synthese komplizierter Stickstoffverbindungen erscheint, statt. Wenn dieser Prozeß der Harnstoffsynthese in Fruchtkörpern, welche sich am Mycel befinden, stattfinden würde, also unter Bedingungen, die die Zuführung des nötigen Stickstoffs in Form von

¹⁾ *F. Hofmeister*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **37**, 426, 1896.

²⁾ *R. Fosse*, Ann. de l'Institut Pasteur **34**, 715, 1920; siehe auch *E. A. Werner*, Dublin, Jour. of med. science **4**, 577.

Ammoniak ermöglichen, so wäre der Aufbau des Harnstoffmoleküls sehr klar: im Fruchtkörper sind anwesend Ammoniak, Kohlehydrat (Trehalose) und ein mächtiger Apparat von Oxydationsfermenten; in meinen Versuchen fällt der erste dieser Faktoren, das Ammoniak, fort, denn dessen Menge ist in den Pilzen äußerst gering; die Destillation des Ammoniaks aus dem Versuchsmaterial ohne vorheriges Kochen mit Säure ergibt äußerst geringe Zahlen; so z. B. wurden im Versuch 7 aus 2 g Material nur 1,09 mg Ammoniakstickstoff erhalten; aber selbst hier kann man nicht behaupten, daß dieser Stickstoff aus Ammoniak oder Ammoniumsalzen stammt, da in den Pilzen labile Stickstoffverbindungen enthalten sind, die bei der Destillation Ammoniak liefern. Es muß zugegeben werden, daß als Material zur Harnstoffsynthese gewisse labile Stickstoffverbindungen, welche nach dem Kochen mit 10proz. Schwefelsäure Ammoniak abspalten (Amidstickstoff nach *Sachse*), dienen können. Die Menge dieses so gebundenen Stickstoffs ist ziemlich bedeutend, auch dann, wenn kein Harnstoff vorhanden ist (Versuch 7), und seine Menge übertrifft stets die Quantität des Harnstoffstickstoffs, wie aus dem Versuch 6 zu ersehen ist:

	Amid-N mg	Harnstoff-N mg
A unreife	32,8	18,3
B reifende	41,1	39,3

Hier haben wir sowohl eine Zunahme des Amidstickstoffs als auch des Harnstoffstickstoffs beim Reifen. Vorläufig kennen wir die Zusammensetzung dieser Verbindungen, von denen sich bei der Harnstoffbildung Ammoniak abspaltet, nicht, aber wir sehen, daß der Harnstoff als Zwischenprodukt bei der Synthese stickstoffhaltiger Substanzen der Pilzsporen erscheint, da diese kein Carbamid mehr enthalten. Soviel wir bis jetzt von der Fermentwirkung im lebenden Körper wissen, können wir in der Harnstoffanhäufung beim Reifen der Pilze nicht das Resultat einer unkoordinierten Tätigkeit des Organismus erblicken. Wenn der Harnstoff nur ein Zwischenprodukt in einer Reihe von chemischen Umwandlungen wäre, so wäre seine Menge in den Lycoperdonen nicht so groß. In diesem Falle erscheint der Harnstoff unzweifelhaft als Stickstoffvorratssubstanz, welche einerseits ganz, andererseits nach Spaltung in Ammoniak und Kohlensäure verbraucht wird. *Boussingault*¹⁾ hat längst ein allgemeines Bild der Oxydationsprozesse bei Pflanzen und Tieren gegeben; er verglich die Amide, den Harnstoff und das Asparagin, welche sich einerseits im Tier-, andererseits im Pflanzenkörper bilden. Dieser Vergleich der Pflanzen- und

¹⁾ *Boussingault*, C. r. 58, 917, 1864.

Tierorganismen kann noch weiter durchgeführt werden — der Harnstoff erscheint in manchen Fällen als ein vorrätiger stickstoffhaltiger Nährstoff in Pflanzen, wie Asparagin in einigen Fällen und Glutamin in anderen. Uns ist unklar, warum verschiedene Pflanzen verschiedene Amide (Asparagin, Glutamin, Harnstoff) anhäufen, aber wir wissen, daß bei der Synthese der Eiweißstoffe diese Amide ausgenutzt werden, indem sie sich teilweise spalten und Ammoniak als Material für Aminosäuren liefern, teilweise aber auch ohne vorhergehende Zerlegung¹⁾ zum Aufbau des Arginins, der Eiweißstoffe und der Purinbasen dienen.

Endgültig bin ich zu folgenden Schlußfolgerungen gekommen:

1. Unreife Exemplare von *Lycoperdon* gehen bei der Aufbewahrung auf Filtrierpapier bei Zimmertemperatur nach einigen Tagen ins Stadium der Reife über und bilden Sporen.

2. Während der Reife findet ein großer Verbrauch stickstofffreier Substanz für die Atmung statt; unter den dabei verbrauchten Substanzen ist vor allem die Trehalose zu nennen.

3. Bei der Reife der Pilze wird im Zusammenhang mit dem großen Verbrauch von Kohlehydraten eine Anhäufung des Stickstoffs beobachtet, woran der Gehalt von 7,12 % bis auf 8,74 % (Versuch 1) steigt.

4. Die Harnstoffmenge nimmt in den reifenden Pilzen zu und verschwindet in den Sporen zur Zeit der völligen Reife.

5. Der Harnstoff befindet sich in den Pilzen nicht im freien Zustande, da bei mehrstündigem Ausziehen mit Alkohol im *Sorhletschen* Apparat derselbe entweder gar nicht oder nur teilweise extrahiert werden kann. In Anbetracht dessen, daß die darauf folgende Behandlung mit heißem Wasser Harnstoff liefert, muß angenommen werden, daß derselbe in einer labilen Verbindung vorliegt, die durch Einwirkung von Wasser gespalten wird.

6. Als Material zur Harnstoffbildung dienen einige labile Stickstoffverbindungen, die beim Kochen mit 10proz. Schwefelsäure Ammoniak abspalten.

7. Der Harnstoff wird beim Reifen der Pilze durch einen lebhaften Oxydationsprozeß bei großem Verbrauch von Atmungsmaterial gebildet.

8. Der Harnstoff muß als stickstoffhaltiger Reservestoff (wie Asparagin und Glutamin) angesehen werden, welcher einerseits direkt zur Synthese des Arginins und der Purinbasen, andererseits nach Spaltung durch die Urease der Pflanzen als Ammoniak zum Aufbau der Körpersubstanzen verwendet werden kann.

¹⁾ Es existieren Literaturangaben, daß Glutamin und Asparagin vollständig in das Eiweißstoffmolekül treten können.

Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro.

Von
B. Sbarsky.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariates für Volksgesundheit
in Moskau.)

(Eingegangen am 9. Oktober 1922.)

Einleitung.

Es ist schon längst bekannt, daß die Eiweißstoffe bei ihrem Durchgehen durch den Verdauungskanal durch die Fermente Pepsin, Trypsin und Erepsin hydrolytisch bis zu Aminosäuren gespalten werden. Die Frage nach dem Schicksal der letzteren, nachdem sie die Darmwand passiert haben, blieb aber lange Zeit unentschieden.

Eine Reihe von Forschern, wie *Schmidt-Mülheim* (1), *Hofmeister* (2), *Neumeister* (3), *Kutscher* und *Seemann* (4), *Cohnheim* (5), *Abderhalden* (6) u. a., suchten nach den Aminosäuren im Serum der Tiere, die sie mit eiweißreicher Nahrung fütterten, doch erfolglos. Es tauchte daher eine Reihe von Hypothesen auf, welche das Nichtauffinden der Aminosäuren im Blute in der Weise erklären wollten, daß letztere schon bei ihrem Durchgang durch die Darmwand chemischen Umwandlungen unterliegen sollen. Wegen der Unzulänglichkeit der zurzeit benutzten Methoden wurden die Untersuchungen über diesen Gegenstand nicht weiter verfolgt. Als in jüngerer Zeit neue Methoden zur quantitativen Bestimmung der Eiweißabbauprodukte (*v. Slyke*, *Folin* und *Denis*, *Sörensen*) ausgearbeitet wurden, nahm das Interesse an diesen Fragen wieder zu, und es erschienen im Jahre 1912 einige Arbeiten, welche sich mit dem Schicksal der Eiweißabbauprodukte im Tierorganismus beschäftigten. Es sind dies die Arbeiten von *v. Slyke* und *Meyer* (7), *Folin* und *Denis* (8), *Costantino* (9), *Abderhalden* (10) und *Bang* (11). All diese Forscher stellten mit Hilfe der neuen Methoden fest, daß Aminosäuren, wenn auch nur in minimalen Mengen, sich während des Verdauungsprozesses im Blute der Tiere auffinden ließen. Es gelang *Abderhalden* in einer mühevollen Arbeit, die Identität dieser Aminosäuren mit denjenigen des Chylus zu beweisen und somit ihren Ursprung festzustellen. Unter den erwähnten Arbeiten beansprucht diejenige von *Costantino* besonderes Interesse. Dieser Forscher suchte nach Aminosäuren nicht nur im Serum, sondern auch im Vollblut und dessen Formelementen. Er machte dabei die Beobachtung, daß die Menge der Aminosäuren in den Formelementen bedeutend höher als im Serum ist.

Im Jahre 1918 wandten *Bach* und *Sbarsky* (12) zur Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Serum von immunisierten Pferden eine neue, von *A. Bach* ausgearbeitete Methode an. Diese weiter unten näher zu beschreibende Methode ermöglichte es, das allmähliche Verschwinden der Eiweißabbauprodukte im Serum von mit Diphtherietoxin immunisierten Pferden quantitativ zu verfolgen.

Es war nun von großem Interesse, mit Hilfe dieser Methode die Frage nach dem Schicksal der Eiweißabbauprodukte im Blute der Tiere nach intravenöser Einführung zu erörtern.

Auf Veranlassung des Herrn *A. Bach* stellte ich in dieser Richtung Untersuchungen an, über die im nachstehenden berichtet werden soll.

II. Methodik.

Die von mir angewandte Methode beruht auf der von *A. Bach* festgestellten Eigenschaft des reduzierenden Ferments der Milch, in Gegenwart von Eiweißabbauprodukten Nitrate zu Nitriten zu reduzieren.

Es ist schon lange bekannt, daß Gewebe die Eigenschaft besitzen, Farbstoffe zu Leukobasen, Nitrate zu Nitriten usw. zu reduzieren. Diese Eigenschaft wird von vielen Forschern der Wirkung eines besonderen Ferments — der Reduktase — zugeschrieben. Indem sich *Bach* die Aufgabe stellte, die Reduktionsprozesse im Organismus näher zu untersuchen, wandte er sich vor allem dem Studium des von *Schardinger* in der Milch entdeckten Ferments zu. *Schardinger* fand, daß frische Milch die Eigenschaft besitzt, in Anwesenheit von Formaldehyd Methylenblau zu entfärben, während gekochter Milch diese Eigenschaft fehlt. In Abwesenheit von Formaldehyd wird Methylenblau durch frische Milch nicht entfärbt. *Bach* (13) fand nun, daß frische Milch nicht nur auf Farbstoffe, sondern auch auf Nitrate unter Mitwirkung von Aldehyden reduzierend wirkt. Es stellte sich somit eine vollständige Ähnlichkeit zwischen der reduzierenden Wirkung der Gewebe und jener der Milch in Anwesenheit von Aldehyden heraus. Es schien daher natürlich, diese beiden Reihen von Erscheinungen in Verbindung zu bringen. Mit Hilfe der von ihm zur Bestimmung des Ferments der Milch ausgearbeiteten quantitativen Methode gelang es *Bach* (14), festzustellen, daß die reduzierenden Eigenschaften der Gewebe durch die gemeinsame Wirkung zweier Faktoren, eines Ferments und eines Koferments, bedingt sind; für sich allein wirkt weder das Ferment noch das Koferment reduzierend. Das Ferment der Gewebe erwies sich als mit demjenigen der Milch identisch. Das Ferment belegte *Bach* mit dem Namen *Perhydridase*. Das Koferment, welches sich den Geweben durch kochendes Wasser entziehen läßt und in seiner Wirkung durch Aldehyde ersetzt werden kann, erwies sich als ein

Gemisch von Abbauprodukten, welche sich bei der fermentativen Hydrolyse der Eiweißstoffe bilden. *Bach* (15) gewann die Perhydridase aus der Leber und bewies durch quantitative Versuche, daß sie in Anwesenheit von Aldehyden auf Farbstoffe und Nitrate genau wie die Perhydridase der Milch reduzierend wirkt. Andererseits wirkt die Perhydridase der Milch in Anwesenheit von gekochten Gewebs-extrakten wie die Reduktase der Gewebe.

Es blieb nun noch festzustellen, welcher Zusammenhang zwischen beiden Kofermenten der Perhydridase — den Aldehyden und den Eiweißabbauprodukten — besteht. Es stellte sich heraus, daß die Aminosäuren nach der von *Strecker* im Jahre 1863 entdeckten Reaktion leicht Aldehyde bilden.

Wenn nun die Perhydridase der Milch für sich allein Nitrate nicht reduziert, es aber in Anwesenheit von Eiweißabbauprodukten tut, so entsteht die Frage, ob man nicht diese Eigenschaft zur quantitativen Bestimmung der Abbauprodukte anwenden könne. Diese Frage ist von *Bach* bejahend beantwortet worden. Er arbeitete eine neue Methode aus und wandte sie zuerst zur Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Harn an (16). Von *Bach* und *Sbarsky* (12) wurde die Methode zur Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Blute und Serum benutzt.

In den Versuchen, die ich zur Erörterung des Schicksals der intra-venös eingeführten Eiweißabbauprodukte angestellt habe, wurde die quantitative Bestimmung dieser Produkte in folgender Weise ausgeführt.

Statt der Perhydridase, deren Isolierung bisher mißlungen ist, nimmt man frische, ungekochte Kuhmilch, am besten von ein und derselben Kuh; zufällig von dem Markte bezogene Milch ist jedenfalls wegen der Verfälschungen zu vermeiden. Es genügt etwa 1 ccm Milch auf 1 ccm der auf Abbauprodukte zu untersuchenden Flüssigkeit. Da die Wirkung des Ferments durch Säure gehemmt wird, so hat man die zu untersuchende Flüssigkeit zu neutralisieren. Selbstverständlich muß die zu untersuchende Flüssigkeit frei von Aldehyden sein, denn, wie schon bemerkt, ersetzen sich gegenseitig Aldehyde und Eiweißabbauprodukte als Koferment. Die Reaktion ist äußerst empfindlich, so daß man gewöhnlich mit $\frac{1}{2}$ ccm Serum bzw. mit 1 ccm Harn auskommen kann. Der Probe fügt man Natriumnitrat in Substanz oder gelöst im Betrage von 4 bis 5 % der Gesamtflüssigkeit hinzu und läßt das Gemisch eine halbe Stunde bei 60° im Thermostaten stehen. Un-erläßliche Kontrollproben: 1. Gekochte Milch und die zu untersuchende Flüssigkeit ohne Nitratzusatz (Probe auf Anwesenheit von Nitriten in der Flüssigkeit oder in der Milch); 2. Die zu untersuchende Flüssigkeit und Nitrat ohne Milchzusatz (Probe auf Anwesenheit von Perhydridase); 3. Milch und Nitrat ohne die zu untersuchende Flüssigkeit (Probe auf

Eiweißabbauprodukte in der Milch). Mit dem *Ilosvay-Lungeschen* Reagens dürfen alle diese Kontrollproben keine Farbenreaktion auf Nitrite geben. Sollte doch eine schwache Färbung entstehen, so wird die entsprechende Nitritmenge bestimmt und in Abzug gebracht. Gibt die dritte Probe ein positives Resultat, so ist die Milch unbrauchbar. Nach halbstündigem Stehen im Thermostaten bei 60° fügt man allen Proben gleiche Mengen des *Ilosvay-Lungeschen* Reagens zu. Eine mehr oder weniger intensive Rosafärbung weist auf die Anwesenheit von Eiweißabbauprodukten in der zu untersuchenden Flüssigkeit hin. Sollte für die zu untersuchende Flüssigkeit eine so hohe Temperatur unpassend sein, so kann man natürlich auch bei 37° arbeiten, nur muß man dann die Reaktionsdauer auf etwa 1 bis 1½ Stunden ausdehnen.

Dies ist die qualitative Probe.

Zur quantitativen Bestimmung versetzt man die aus dem Thermostaten herausgenommenen Proben mit einer bestimmten Menge gesättigter und klarer Lösung von basischem Bleiacetat, die Mischung wird durchgeschüttelt und durch ein trockenes Filter filtriert. Das Filterpapier ist mit dem *Ilosvay-Lunge*-Reagens auf Nitrite zu prüfen. Zu einem aliquoten Teil des vollkommen klaren und farblosen Filtrats wird nun das *Ilosvay-Lunge*-Reagens gegeben und die entstandene Färbung wird mit der Färbung, welche eine bestimmte Menge einer titrierten Nitritlösung mit demselben Reagens gibt, verglichen. Man kann natürlich dabei Kolorimeter benutzen; wir wenden gewöhnlich graduierte Reagenzgläser an, welche mit Glasstöpseln versehen sind (sogenannte *Iken*-Reagenzgläser), und erhalten dabei ganz vergleichbare Resultate. Die Resultate werden in Milligrammen N_2O_3 auf ein bestimmtes Volumen oder Gewicht des zu untersuchenden Stoffes bezogen.

III. Schicksal der intravenös eingeführten Eiweißabbauprodukte.

Wie wir aus der betreffenden Literatur entnehmen, verschwindet das parenteral eingeführte Pepton (*Schmidt-Mülheim*) und einzelne Aminosäuren, wie Alanin z. B. (*Folin* und *Denis*), sehr schnell aus der Blutbahn: schon einige Sekunden nach der Injektion ist die eingeführte Aminosäure im Blutserum nicht mehr zu entdecken.

Ich stellte mir die Aufgabe, das Schicksal der dem Kaninchen intravenös eingeführten Eiweißabbauprodukte zu ermitteln, indem ich nicht isolierte Aminosäuren, sondern das Gemisch von Eiweißabbauprodukten, wie man es beim fermentativen Abbau des Proteinstoffs erhält, einspritzte. In die Ohrvene des Kaninchens wurde Erepton, das Produkt der tiefen Fleischhydrolyse, in verschiedenen Konzentrationen eingeführt, und bald darauf wurde eine Blutprobe entnommen und das Serum auf seinen Gehalt an Erepton nach der oben angegebenen Methode untersucht. Selbstverständlich war zunächst erforderlich,

die Aktivität des Ereptons als Koferment der Perhydridase durch Bestimmung der Nitritmenge, welche man bei der Reduktion des Nitrats durch die Einwirkung des Systems Perhydridase + Erepton gewinnt, zu ermitteln. Eine Mischung von 2 ccm Milch und 1 ccm einer 1proz. Ereptonlösung und 3 ccm einer 25proz. Natriumnitratlösung wurde also eine halbe Stunde im Thermostaten bei 60° stehen gelassen, dann mit 5 ccm einer gesättigten basischen Bleiacetatlösung versetzt, filtriert, und in 5 ccm des Filtrats wurde die Menge des entstehenden Nitrits mit dem *Ilosvay-Lungeschen* Reagens bestimmt.

Die Versuche ergaben, daß eine 1proz. Ereptonlösung im Mittel 0,008 mg N_2O_3 pro Kubikzentimeter gibt, während nach *Lunge* es noch möglich ist, 0,001 mg N_2O_3 in einem Liter Wasser zu bestimmen. Indem ich dem Kaninchen eine bestimmte Ereptonmenge intravenös einführte, konnte ich dessen Konzentration im Blute annähernd berechnen. Nach der Differenz zwischen der berechneten und der gefundenen Nitritmenge konnte ich auf die Menge des aus dem Serum verschwundenen Ereptons schließen.

Vor jeder Einspritzung wurden einige Kubikzentimeter Blut aus der Ohrvene genommen und dessen Serum auf Eiweißabbauprodukte untersucht. In keinem einzigen Falle fand eine Reduktion des Nitrats statt, womit wiederum die zuerst von *Bach*, dann von *Bach* und *Sbarsky* festgestellte Tatsache, daß im Serum normaler Tiere sich keine oder nur minimale Spuren von Eiweißabbauprodukten befinden, bestätigt wurde.

Sogleich nach der Injektion wurde wiederum aus der Ohrvene Blut entnommen und das Serum auf Erepton untersucht.

Sechs Kaninchen wurden in dieser Weise mit 1 bis 3,5 g Erepton behandelt. Im Serum der Tiere dürfte man dementsprechend Ereptonmengen erwarten, welche 0,0084 mg N_2O_3 pro 1 ccm liefern sollten. Ich konnte aber *nicht einmal Spuren von Eiweißabbauprodukten nachweisen*.

Wie bereits erwähnt, hat *Costantino* in den roten Blutkörperchen während des Verdauungsprozesses eine größere Menge von Aminosäuren als im Serum gefunden. Ich wiederholte daher die soeben beschriebenen Versuche, aber statt Serum wurde das Vollblut (Oxalatblut) zur Bestimmung des Ereptons benutzt. Hierbei war es erforderlich, die Methode einigermaßen abzuändern. Es zeigte sich nämlich, daß das Filtrat nach dem Hinzufügen von basischem Bleiacetat eine Rosa- oder Braunfärbung annimmt, was die kolorimetrische Bestimmung stört. Diesem Übelstand kann man vorbeugen, indem man dem Filtrat 0,5 ccm einer gesättigten alkoholischen Chlorzinklösung zugibt und filtriert. Das so gewonnene Filtrat ist stets farblos. Durch besondere Versuche wurde festgestellt, daß der Zusatz von Chlorzink keinen

Einfluß auf den Nachweis des Nitrits ausübt. Die Versuche mit Vollblut ergaben ähnliche Resultate wie die Versuche mit Serum, d. h. es gelang nicht, in der Blutbahn nach der Injektion Eiweißabbauprodukte zu finden. Nur in Fällen, wo eine Hämolyse stattgefunden hatte, konnten geringe Mengen von Abbauprodukten nachgewiesen werden.

Ähnliche Versuche wurden weiter mit *Diphtherietoxin* angestellt. Letzteres enthält bekanntlich beträchtliche Mengen von Eiweißabbauprodukten, welche sich bei der Lebensbetätigung der Diphtheriebazillen auf Peptonbouillon bilden. Das Toxin, welches mir zur Verfügung stand (Letaldosis 0,0205), zeigte eine sehr deutliche Reaktion auf Eiweißabbauprodukte: 0,01 ccm ergab 0,004 mg N_2O_3 . Das Toxin wurde den Kaninchen in die Ohrvene eingespritzt. Zur Schonung der Versuchstiere wurde bei höheren Dosen das Toxin durch Erhitzen zum Kochen inaktiviert. Die Reaktion auf Eiweißabbauprodukte wird nicht dadurch beeinträchtigt.

Neun Kaninchen erhielten von 5 bis 35 ccm Diphtherietoxin. Man hätte hierbei pro Kubikzentimeter Serum von 0,0103 bis 0,1065 mg N_2O_3 erhalten sollen. Tatsächlich wurden aber nur bei zwei Tieren Spuren von Abbauprodukten im Serum aufgefunden. Die übrigen gaben wiederum nicht die mindeste Reaktion auf Nitrite bzw. Eiweißabbauprodukte.

Das Verschwinden großer Mengen von Eiweißabbauprodukten aus der Blutbahn konnte in erster Linie durch die Annahme erklärt werden, daß dieselben sofort nach ihrem Eintritt von den Zellen der Organe dem Blute entzogen werden. Auch wurde in dieser Weise von *Folin* und *Denis* das Verschwinden des bei ihren Versuchen parenteral eingeführten Alanins erklärt.

Das Verschwinden der Toxine aus der Blutbahn von empfindlichen Tieren erklärte *Ehrlich* durch dieselbe Annahme, welche zur Aufstellung der sehr komplizierten Seitenkettentheorie Veranlassung gab. Um diese Annahme auch in unserem Falle einer Prüfung zu unterziehen, war es nötig, die Versuche unter Ausschluß der Organe, d. h. in vitro auszuführen.

Sind die Organgewebe für das Verschwinden der Eiweißabbauprodukte verantwortlich, so dürfte beim Vermischen von Erepton- oder Toxinlösungen mit Blut keine Abnahme des Gehalts an nicht gebundenen Eiweißabbauprodukten stattfinden.

Die Versuche wurden mit Serum und Vollblut (Oxalatblut) in folgender Weise angestellt.

Serum und Toxin wurden in bestimmten, in nachstehender Tabelle I angegebenen Verhältnissen vermischt und im Brutschrank 15 Minuten bei 37° stehen gelassen. Zu jedem Gemisch wurden dann Natriumnitrat und frische Milch gegeben und die Proben wurden weiter im

Brutschrank 30 Minuten bei 50° aufbewahrt, worauf die Bestimmung der Nitrite erfolgte in der oben angegebenen Weise. In den Kontrollversuchen wurde das Serum durch die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

Tabelle I.

Nr.	Serummenge ccm	Toxinmenge ccm	Milligramm N_2O_3	
			Hauptversuch	Kontrollversuch
1	1,0	0,5	0,0170	0,0125
2	1,5	0,5	0,0190	0,0125
3	2,0	0,5	0,0220	0,0125
4	2,5	0,5	0,0230	0,0125
5	3,0	0,5	0,0220	0,0125
6	1,0	1,0	0,0380	0,0350
7	1,5	1,0	0,0390	0,0350
8	2,0	1,0	0,0400	0,0350
9	2,5	1,0	0,0480	0,0350
10	3,0	1,0	0,0495	0,0350

Obige Zahlen lassen erkennen, daß dem Serum hinzugefügte Eiweißabbauprodukte nicht nur keine Abnahme, sondern sogar eine beträchtliche Zunahme ihrer Menge aufweisen.

Die Ursache dieser Erscheinung wurde von uns in einer anderen Arbeit aufgeklärt. Das Tierserum besitzt nämlich die Fähigkeit, die Wirkung der Perhydridase zu fördern, indem es durch seine Puffer-eigenschaften störende Einflüsse (Zunahme der Wasserstoffionen-konzentration) beseitigt. Ganz andere Resultate wurden mit dem Vollblut erhalten. Die Versuche wurden mit je 3 ccm Oxalatblut ausgeführt. Im Kontrollversuch wurde das Blut durch die gleiche Menge 0.2proz. Ammoniumoxalatlösung ersetzt.

Tabelle II.

Nr.	Blutmenge ccm	Toxinmenge ccm	Milligramm N_2O_3	
			Hauptversuch	Kontrollversuch
1	3	0,5	0,0076	0,0115
2	3	1,0	0,0117	0,0200
3	3	1,0	0,0105	0,0210
4	3	0,5	0,0070	0,0110
5	3	1,0	0,0095	0,0208
6	3	1,5	0,0130	0,0310
7	3	1,5	0,0128	0,0307
8	3	1,5	0,0115	0,0302

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß dem Blute zugeführte Eiweißabbauprodukte in beträchtlichen Mengen aus dem Reaktionsgemisch verschwinden. Die Abnahme beträgt 30 bis 70 %.

Da die Wirkung der Organgewebe hier ausgeschlossen ist, so kann diese Erscheinung in zweifacher Weise erklärt werden: 1. Die Nitrite, welche sich bei der Reduktion des Nitrats bilden, erfahren weitere Umwandlungen und entgehen daher dem chemischen Nachweis. 2. Die Abbauprodukte erleiden im Blute chemische oder physikalische Umwandlungen, durch welche sie die Fähigkeit, der Perhydridase der Milch als Koferment zu dienen, verlieren.

Versuche ergaben, daß eine geringe Menge des dem Blute von vornherein zugesetzten Nitrits wirklich verschwindet; diese Verluste betragen aber nur 8 bis 10 % der hinzugefügten Menge, wodurch natürlich das Verschwinden von 30 bis 70 % der den Eiweißabbauprodukten entsprechenden Nitritmenge nicht erklärt werden kann. Die zweite Annahme hat sich insofern bestätigt, als die Eiweißabbauprodukte zwar chemisch unverändert bleiben, aber von den Formelementen des Blutes *adsorbiert und dem Reaktionskreise entzogen werden*. Dies geht aus folgendem, vielfach wiederholtem Versuch hervor.

6 ccm Blut und 2 ccm Toxin werden eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37° gehalten, die Hälfte des Gemisches wird mit einer Pipette in ein anderes Reagenzglas übertragen und zum Kochen erhitzt. In beiden Proben werden dann die Eiweißabbauprodukte in obiger Weise bestimmt. Dabei zeigt die ungekochte Probe ein beträchtliches Schwinden derselben, während in der gekochten sowie auch in der Kontrollprobe die ganze hinzugefügte Menge wieder zu finden ist.

Als Beispiel sollen hier die Resultate einiger Versuche angegeben werden.

Tabelle III.

Blutmenge	Toxinmenge	Milligramm N_2O_3 in ccm		
		Hauptversuch		Kontrollversuch
		Ungekochtes Blut	Gekochtes Blut	
ccm	ccm			
3	0,5	0,0126	0,0700	0,0660
3	1,0	0,0550	0,1100	0,1080
3	0,5	0,0060	0,0600	0,0570
3	1,0	0,0320	0,0900	0,0920
3	1,0	0,0455	0,0800	0,0880
3	2,0	0,0550	0,1100	0,1053

Die Formelemente des Blutes adsorbieren also die Eiweißabbauprodukte und geben sie bei ihrer Zerstörung durch Kochen in unverändertem Zustande wieder ab.

Diese Resultate gaben zu der Vermutung Veranlassung, daß die Ursache des Verschwindens der Abbauprodukte in der Blutbahn nach der Injektion nicht in deren Umwandlung durch die Organ-

gewebe, sondern in deren Adsorption durch die Formelemente des Blutes liege.

Durch Versuche in vivo wurde diese Vermutung völlig bestätigt. Kaninchen wurde Diphtherietoxin eingespritzt und dann in einer gekochten und einer ungekochten Probe des Oxalatblutes die Menge der Eiweißabbauprodukte bestimmt. Einige Resultate seien hier angeführt.

Tabelle IV.

Blutmenge ccm	Eingespritzte Toxinmenge ccm	Milligramm N_2O_3 in 0 ccm			
		vor der Injektion		nach der Injektion	
		Ungekocht. Blut	Gekochtes Blut	Ungekocht. Blut	Gekochtes Blut
5	10	0	0,0020	0	0,0043
7	20	0	0,0016	0	0,0051
5	20	0	0,0011	Spuren	0,0062
5	15	0	0,0044	0	0,0048
6	15	0	0,0028	Spuren	0,0068
7	15	0	0,0016	0	0,0035

Wie aus diesen Zahlen zu ersehen ist, kommt im Blute normaler Kaninchen eine geringe Menge von Eiweißabbauprodukten in adsorbiertem Zustand vor, weshalb letztere erst nach der Zerstörung der Formelemente des Blutes nachzuweisen sind. Nach der Toxininjektion sind im ungekochten Blute keine Abbauprodukte zu finden, das gekochte Blut weist dagegen beträchtlich mehr Eiweißabbauprodukte als vor der Injektion auf. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß den Blutkörperchen die bemerkenswerte Eigenschaft zukommt, Eiweißabbauprodukte sowohl in vitro wie in vivo zu adsorbieren.

Es ist nicht zu verwundern, daß die Frage nach dem Schicksal der Eiweißabbauprodukte im Tierorganismus solange ungelöst geblieben war. Sämtliche Forscher gingen von dem Gedanken aus, daß das Serum alle Reaktionen des Blutes völlig abspiegelt. Das Mißlingen aller Bemühungen, die Eiweißabbauprodukte im Serum zu finden, erklärt sich einfach dadurch, daß die Menge der letzteren im Normalserum fast gleich Null ist. Nur *Costantino*, welcher zuerst das Vollblut untersuchte, konnte zeigen, daß während der Verdauung die roten Blutkörperchen größere Mengen von Aminosäuren als das Serum enthalten. Leider kam *Costantino* nicht auf den Gedanken, seine Versuche auch auf gekochtes Blut, normales oder mit Aminosäuren versetztes, auszudehnen. Seine Arbeit blieb allerdings unbeachtet.

Die mit Kaninchenblut gewonnenen Resultate wurden auch mit Meerschweinchen- und Pferdeblut bestätigt. Versuche über die Adsorption der Eiweißabbauprodukte durch die Formelemente des Blutes verschiedener Tiere sind im Gange.

Zusammenfassung und weitere Aussichten.

Unter Anwendung einer neuen, von *Bach* herrührenden Methode zur quantitativen Bestimmung der Abbauprodukte der Proteinstoffe wurde versucht, das Schicksal parenteral eingeführten Ereptons und Diphtherietoxins bei Kaninchen zu ermitteln.

Nach Einführen verhältnismäßig sehr großer Mengen Ereptons (3,5 g) oder Toxins (35 ccm) und sofortiger Blutentnahme wird im Serum der Tiere keine Spur von Eiweißabbauprodukten aufgefunden. Das gleiche gilt auch für das Vollblut. Wird das nach Einführen von Eiweißabbauprodukten sofort entnommene Blut zum Kochen erhitzt, so findet man die eingespritzten Abbauprodukte fast quantitativ wieder auf. In vitro werden die gleichen Resultate wie in vivo erhalten. Daraus ergibt sich, daß die Abbauprodukte der Proteinstoffe durch die Formelemente des Blutes adsorbiert und dem chemischen Nachweis entzogen werden. Nach Zerstörung der Formelemente durch Erhitzen treten die Abbauprodukte im ursprünglichen Zustand wieder auf.

Diese Ergebnisse legen den Gedanken nahe, daß zwischen der Fähigkeit der Formelemente des Blutes, Proteinabbaustoffe zu adsorbieren, und den Erscheinungen der Immunisation irgend ein Zusammenhang besteht. Zieht man in Betracht, 1. daß der Immunisationsprozeß sich im Blute abspielt, 2. daß die durch Bakteriolyse erzeugten Toxine unzweifelhaft Abbauprodukte der Proteinstoffe sind, so kann man es für sehr wahrscheinlich halten, daß *der erste Akt des Immunisationsprozesses die Adsorption der Toxine durch die Blutkörperchen ist*. Bei immunisierten oder von Natur aus immunen Tieren scheint das Toxin nicht adsorbiert und nach einigem Kreisen im Blute ausgeschieden zu werden. Diese Annahme stimmt mit der von *Ehrlich* festgestellten Tatsache überein, daß Ratten eingespritztes Diphtherietoxin auf Meerschweinchen mit dem Serum sich übertragen läßt, während das Serum mit demselben Toxin behandelter Meerschweinchen völlig wirkungslos ist. Nun sind Ratten dem Diphtherietoxin gegenüber unempfindlich, Meerschweinchen dagegen sehr empfindlich. Diese Annahme steht weiterhin mit der von *Bach* und *Sbarsky* gemachten Beobachtung im Einklang, daß am Ende der Immunisation eingeführtes Diphtherietoxin noch 1 bis 4 Tage nach dem Einführen im Serum der Pferde nachweisbar ist, während es bei normalen Tieren nicht der Fall ist.

Von dieser Annahme ausgehend, stellte ich in verschiedenen Richtungen Versuche an, über deren Ergebnisse in späteren Mitteilungen berichtet werden soll.

Literatur.

- 1) *Schmidt-Mülheim*, Arch. f. Physiol. 1880, S. 33 (zitiert nach *Hofmeister*). — 2) *F. Hofmeister*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 127, 1881. — 3) *R. Neumeister*, Zeitschr. f. Biol. 24, 5, 272, 1888. — 4) *Kutscher* und *Seemann*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 528, 1902. — 5) *O. Cohnheim*, ebendasselbst 85, 346, 1902. — 6) *E. Abderhalden*, ebendasselbst 44, 17, 1905; 51, 269, 1907; 58, 113, 1907. — 7) *D. v. Slyke* und *G. Meyer*, Journ. of biol. Chem. 12, 339, 398, 1912. — 8) *O. Folin* und *W. Denis*, ebendasselbst 12, 141, 252, 259, 1912. — 9) *A. Costantino*, diese Zeitschr. 55, 411, 419, 1913. — 10) *E. Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 114, 280, 1921. — 11) *I. Bang*, diese Zeitschr. 74, 294, 1916. — 12) *A. Bach* und *B. Sbarsky*, C. r. de l'Acad. des Scien. 171, 1175, 1920. — 13) *A. Bach*, diese Zeitschr. 88, 282, 1911. — 14) *Derselbe*, ebendasselbst 88, 154, 1912. — 15) *Derselbe*, ebendasselbst 58, 205, 1913. — 16) *Derselbe*, C. r. de l'Acad. des Scien. 164, 248, 1917.
-

Scheinbare auxo- und antifermentative Eigenschaften des Serums.

Von

A. Bach, B. Sbarsky und K. Nikolajew.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit
in Moskau.)

(Eingegangen am 9. Oktober 1922.)

In einer Reihe von Mitteilungen wurde von A. Bach¹⁾ dargetan, daß die längst bekannte Eigenschaft der pflanzlichen und tierischen Gewebe, Farbstoffe zu Leukobasen, Nitrate zu Nitriten usw. zu reduzieren, beruht auf der Zusammenwirkung eines Ferments und eines Koferments, von denen jedes für sich allein wirkungslos ist. Das Ferment, welches der Reihe nach als Salicylase, Aldehydase, Oxydo-Reduktase, Aldehydkatalase, indirekte Reduktase, *Schardinger*-Enzym, Aldehydmutase, Perhydridase, Dehydrogenase, Dismutase, Oxyhydrase bezeichnet worden ist, kommt in frischer Milch getrennt von seinem Koferment vor. Letzteres läßt sich den Geweben durch kochendes Wasser entziehen und kann in seiner Wirkung durch Aldehyde ersetzt werden. Es hat sich als ein Gemisch von Proteinabbauprodukten erwiesen, und seine Ersetzbarkeit durch Aldehyde erklärt sich dadurch, daß durch Wechselwirkung zwischen gewissen Ketoverbindungen und α -Aminosäuren aus den Abbauprodukten nach der *Strecker*'schen Reaktion Aldehyde entstehen.

Da native Proteinstoffe nicht als Koferment der Perhydridase²⁾ fungieren, schien es von Interesse, festzustellen, in welchem Stadium des Abbaus Produkte auftreten, denen die Fähigkeit zukommt, mit diesem Ferment ein reduzierendes System herzustellen.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß reines Serumalbumin (*Kahlbaum*) der Hydrolyse mit Schwefelsäure in der bekannten Weise unterworfen wurde, dem Reaktionsgemisch zu bestimmten Zeiten entnommene Proben wurden genau mit reiner Soda neutralisiert, mit

¹⁾ Diese Zeitschr. 31, 443; 33, 282, 1911; 33, 154, 1912; 52, 412; 58, 205, 1913.

²⁾ Solange über die Nomenklatur dieses Ferments kein Einverständnis herrscht, wollen wir die Bezeichnung *Perhydridase* beibehalten.

frischer Milch und Natriumnitrat in der früher beschriebenen Weise zusammengebracht, im Thermostaten bei 60° eine halbe Stunde aufbewahrt, mit basischem Bleiacetat gefällt und auf Nitritgehalt untersucht.

Es zeigte sich, daß die Säurehydrolyse des Serumalbumins im Gegensatz zu der fermentativen Hydrolyse keine Produkte liefert, die imstande sind, als Koferment der Perhydridase zu fungieren. Der Gedanke lag am nächsten, daß bei der Säurehydrolyse Substanzen entstehen, welche auf die Perhydridase einen hemmenden Einfluß ausüben. Versuche ergaben aber zu unserer Überraschung, daß die genannten Abbauprodukte auf die Perhydridase nicht hemmend, sondern beträchtlich *fördernd* einwirken.

2 ccm Milch, 0,25 g Natriumnitrat, 0,0025 g Acetaldehyd, 1 ccm neutralisiertes Hydrolysat wurden im Thermostaten bei 60° eine halbe Stunde stehen gelassen, das Gemisch wurde mit 1 ccm gesättigter basischer Bleiacetatlösung behandelt, durch ein trockenes Filter filtriert und vom klaren Filtrat wurden 3 ccm mit dem gleichen Volumen des *Ilosvay-Lungeschen* Reagens vermischt und das entstandene Nitrit kolorimetrisch bestimmt. Gleichzeitig wurden Kontrollversuche mit frischer Milch, Nitrat und Acetaldehyd ohne Hydrolysat und mit *gekochter* Milch, Nitrat, Aldehyd und Hydrolysat angestellt.

Milligramm N_2O_3

ohne Hydrolysat	mit Hydrolysat	Gekochte Milch und Hydrolysat
0,0218	0,0562	0

Da für die Hydrolyse Serumalbumin angewandt worden war, suchten wir weiter zu ermitteln, ob dem normalen Serum eine ähnliche fördernde Wirkung wie seinen Abbauprodukten zukommt. Es stellte sich heraus, daß dies tatsächlich der Fall ist.

Versuche wie oben angegeben, mit 1 ccm Serum (Ziege) anstatt Hydrolysat.

Milligramm N_2O_3

Acetaldehyd o. Serum	Serum o. Acetaldehyd	Serum u. Acetaldehyd
0,0285	0	0,0923

Ähnliche Resultate wurden mit Meerschweinchen-, Kaninchen- und Pferdeserum erhalten. Es schien also hier eine neue Eigenschaft der normalen Sera vorzuliegen.

Beim Nachschlagen der bei uns nach längerer Unterbrechung eingetroffenen neueren Literatur fanden wir Arbeiten von *Jacoby* und *Falk*¹⁾, *Jacoby* und *Umeda*²⁾, *Rona* und *György*³⁾ und *Jacoby*⁴⁾, die sich mit dem fördernden Einfluß des Serums der Säugetiere auf die Ureasewirkung beschäftigen. *Jacoby* und *Falk* nehmen an, daß dieser fördernde Einfluß einer im Serum enthaltenen bestimmten Substanz, welche sie mit dem Namen „Auxorease“ belegen, zukomme. Die Substanz soll spezifisch

1) Diese Zeitschr. 59.

2) Ebendasselbst 68.

3) Ebendasselbst 111.

4) Ebendasselbst 114, 152.

wirken. Von *Rona*¹⁾ wurde zunächst die Ansicht ausgesprochen, daß die „auxoureatische“ Wirkung des Serums auf seine Puffereigenschaften zurückzuführen sei. Später fanden aber *Rona* und *György* (l. c.), daß bei langdauernder Einwirkung Serum auch in gepufferten Lösungen auf die Ureasereaktion einen fördernden Einfluß ausübt.

Auf Grund obiger Tatsachen könnte man auch den von uns gemachten Befund dahin deuten, daß im normalen Serum eine auf die Perhydridase-wirkung eingestellte „Auxosubstanz“ vorkomme. Wir hielten es aber für wahrscheinlicher, daß in Übereinstimmung mit der ursprünglichen Annahme *Ronas* es sich hier lediglich um eine durch den Serumzusatz herbeigeführte Änderung der Reaktion der Versuchsflüssigkeit handle. Wir stellten daher Versuche mit Milch, Nitrat, Acetaldehyd und Serum in gepufferten Lösungen an, erhielten aber dabei keine brauchbaren Resultate, weil beim nachträglichen Fällen mit basischem Bleiacetat und Filtrieren trübe, kolloide Flüssigkeiten entstehen, die für kolorimetrische Bestimmungen ungeeignet sind. Wir schlugen daher einen anderen Weg ein.

Bekanntlich wirkt die Phenolase bzw. das System Peroxydase + Hydroperoxyd oxydierend auf eine Reihe verschiedener Substanzen, denen nur die Anwesenheit von beweglichem Wasserstoff im Molekül gemein ist. Von diesen Substanzen werden durch das genannte Oxydationsagens die einen in schwach saurer, die anderen in schwach alkalischer Lösung schneller als in völlig neutraler oxydiert. Falls also die Wirksamkeit des Serums auf seiner Fähigkeit, H-Ionen zu binden, beruht, so wird es auf die Phenolasereaktion je nach der Natur der Substrate einen fördernden oder einen hemmenden Einfluß ausüben, d. h. bald *auxofermentative*, bald *antifermentative* Eigenschaften aufweisen. In gepufferten Lösungen wird es dagegen ganz unabhängig von der Natur der Substrate wirkungslos bleiben. Diese Voraussetzungen haben sich völlig bestätigt.

Versuche wurden mit Guajakol, p-Phenylendiamin, Benzidin, Pyrogallol, Hydrochinon und Orcin ausgeführt. Für die Oxydation ersterer drei Substrate ist eine schwach saure, für die Oxydation letzterer drei eine schwach alkalische Reaktion günstig²⁾. Die angewandte Phenolaselösung wurde aus Pilzen (*Lactarius vellereus*) dargestellt. Sie zeigte eine mäßige Aktivität, da 10 ccm Phenolaselösung mit 40 ccm 2,5proz. Pyrogallollösung zusammengebracht und mit Luft 24 Stunden behandelt, nur 0,046 g Purpurogallin ergaben.

Versuche mit Guajakol.

Der Einfluß des Serumzusatzes auf die Oxydation des Guajakols durch den Luftsauerstoff unter Mitwirkung der Phenolase wurde nach der von *Bach* und *Zubkova*³⁾ ausgearbeiteten kolorimetrischen

¹⁾ Sitzung der Physiologischen Gesellschaft vom 24. Juli 1914 (zitiert nach *Jacoby*).

²⁾ Vgl. *A. Bach*, Sur les réactions de la peroxydase purifiée par ultrafiltration. Archives d. Sciences phys. et naturelles. Genève 1917.

³⁾ Diese Zeitschr. 1921.

Methode messend verfolgt. Die Verhältnisse wurden so gewählt, daß während der Versuchsdauer nur lösliche, gefärbte Oxydationsprodukte auftraten. Je 1 ccm 0,1prozentige Guajakollösung, 0,5 ccm Phenolaselösung, 0,5 oder 1 ccm Pferdeserum und Wasser bis auf 10 ccm wurden in Kolorimeterröhren zusammengebracht, das Gemisch wurde gut durchgeschüttelt und im Kolorimeter mit den Röhren der Skala verglichen, wobei die Zeiten notiert wurden, welche bis zur Ausgleichung der Färbungen mit den aufeinander folgenden Stufen der Skala verliefen. Gleichzeitig wurden Versuche ohne Serumzusatz in gepufferten Lösungen ausgeführt. Der Puffer wurde nach *Michaelis* dargestellt: $[H^+] = 1 \times 10^{-7}$.

Skala:	Zeit in Minuten.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Oxydiertes Guajakol mg	0,042	0,079	0,117	0,161	0,198	0,235	0,280	0,320
Ohne Serumzusatz	9,5	13	17	26	41	60	78	96
0,5 ccm Serum	16	81	—	—	—	—	—	—
1,0 „ „	18	103	—	—	—	—	—	—
1,0 „ „ gepuffert	10	14,5	19	28	43	64	79	99

Zusatz von 0,5 bis 1 ccm Serum verzögert also beträchtlich die Oxydation des Guajakols durch die Vermittlung der Phenolase und bringt die Reaktion zum Stillstand, wenn nur etwa $\frac{1}{12}$ des anwesenden Substrates oxydiert worden ist. In gepuffelter Lösung verläuft die Reaktion praktisch wie ohne Serumzusatz.

Versuche mit *p*-Phenylendiamin.

Bei der Oxydation des *p*-Phenylendiamins werden nur dann violette Oxydationsprodukte erhalten, wenn Säure zugegen ist. Dabei nimmt die Violettfärbung mit steigender Säuremenge bis auf ein Maximum zu, welches dem Verhältnis *p*-Phenylendiamin : Säure = 1 Äquiv. : 0,5 Äquiv. entspricht¹⁾. In neutraler oder schwach alkalischer Lösung entstehen gelbbraun gefärbte Produkte. Die Oxydationsversuche mit Phenolase in Gegenwart von Serum konnten wegen der völligen Verschiedenheit der Färbungen in An- und Abwesenheit von Säure nur qualitativ durchgeführt werden.

Bringt man 1 ccm n/100 *p*-Phenylendiaminlösung, 0,5 ccm n/100 Salzsäure, 0,5 ccm Phenolaselösung, 1 ccm Pferdeserum und Wasser bis auf 10 ccm zusammen, so färbt sich das Gemisch allmählich gelbbraun, aber auch nach längerem Stehenlassen an der Luft wird keine Spur von Violettfärbung beobachtet. Eine zu gleicher Zeit angestellte Kontrollprobe ohne Serumzusatz färbt sich schon nach kurzer Zeit intensiv violett. Wendet man 0,5 ccm Serum anstatt 1 ccm an, so färbt sich das Reaktionsgemisch

¹⁾ Vgl. A. Bach, Fermentforschung 1, 197, 1915.

zugleich braungelb und violett. Mit 0,25 ccm Serum ist die Violettfärbung deutlicher als mit 0,5 ccm. Es ist hier einleuchtend, daß das zugesetzte Serum nur insofern auf die Bildung des violetten Farbstoffs hemmend wirkt, als es die dafür erforderlichen H-Ionen abfängt. Setzt man den braungelben Reaktionsgemischen vorsichtig Säure zu, so erhält man rein violette Lösungen.

Versuche mit Benzidin.

Ganz ähnlich verliefen Versuche mit Benzidin und Salzsäure: tiefblaue Färbung in der Kontrollprobe, gelbbraune bei Zusatz von 1 ccm Pferdeserum, blaubraune bei Zusatz von geringeren Serum-mengen. In gepufferten Lösungen treten normale Blaufärbungen auf.

Versuche mit Pyrogallol.

5 Kolorimeterröhrchen wurden mit je 1 ccm $n/_{100}$ Pyrogallollösung, 0,5 ccm Phenolaselösung, 0,25 ccm Pferdeserum und Wasser bis auf 10 ccm beschickt. Gleichzeitig wurde eine Kontrollprobe ohne Serum-zusatz angestellt. Schon nach kurzer Zeit zeigten die mit Serum versetzten Proben eine intensivere Braungelbfärbung als die Kontrollprobe. Nach Verlauf von 15 Minuten wurde zu einer der Serum-proben so viel Wasser aus einer Bürette gegeben, als zur Ausgleichung der Färbungen der Serumprobe und der Kontrollprobe erforderlich war. Aus den Volumverhältnissen ließen sich die relativen Färbungs-intensitäten (Kontrollprobe: Serumprobe) berechnen. Nach Verlauf von 30 Minuten wurde die gleiche Bestimmung mit einer anderen Serumprobe ausgeführt usw. Eine zweite Versuchsreihe wurde mit 0,5 ccm Serum, eine dritte mit 1,0 ccm Serum unter gleichen Bedingungen ausgeführt. Dabei wurden nachstehende Resultate erhalten.

Zeit in Minuten	Kontrollprobe: Serumprobe		
	0,25 ccm Serum	0,5 ccm Serum	1,0 ccm Serum
15	1 : 1,30	1 : 1,60	1 : 1,80
30	1 : 1,35	1 : 1,65	1 : 1,75
45	1 : 1,30	1 : 1,70	1 : 1,80
60	1 : 1,35	1 : 1,70	1 : 1,95
90	1 : 1,40	1 : 1,60	1 : 1,80

In gepufferten Lösungen übt der Serumzusatz praktisch keinen Einfluß auf die Oxydation des Pyrogallols aus. In Abwesenheit von Phenolase wird die Oxydation des Pyrogallols während der Versuchsdauer durch den Serumzusatz nicht merklich beeinflusst.

Versuche mit Hydrochinon.

6 Kolorimeterröhrchen erhielten je 1 ccm $n/_{100}$ Hydrochinonlösung, 0,25 ccm Pferdeserum, 0,5 ccm Phenolaselösung, Wasser bis auf 10 ccm.

Kontrollprobe ohne Serumzusatz. Zwei weitere Versuchsreihen mit 0,5 und 1,0 ccm Serum.

Zeit in Minuten	Kontrollprobe: Serumprobe		
	0,25 ccm Serum	0,5 ccm Serum	1,0 ccm Serum
15	—	1 : 1,25	1 : 1,60
30	1 : 1,15	1 : 1,30	1 : 1,65
45	1 : 1,15	1 : 1,35	1 : 1,60
60	1 : 1,10	1 : 1,30	1 : 1,60
90	1 : 1,20	1 : 1,35	1 : 1,60
120	1 : 1,20	1 : 1,40	1 : 1,65

Versuche mit Orcin.

Verhältnisse wie oben.

Zeit in Minuten	Kontrollprobe: Serumprobe		
	0,25 ccm Serum	0,5 ccm Serum	1,0 ccm Serum
15	—	1 : 1,25	1 : 1,50
30	1 : 1,10	1 : 1,30	1 : 1,55
45	1 : 1,15	1 : 1,25	1 : 1,50
60	1 : 1,10	1 : 1,25	1 : 1,55
90	1 : 1,10	1 : 1,30	1 : 1,50
120	1 : 1,10	1 : 1,30	1 : 1,55

Durch weitere Versuche, auf welche wir hier nicht näher eingehen wollen, wurde festgestellt, daß reines Serumalbumin, Ovalbumin und Casein sowohl auf die Wirkung der Perhydridase, wie auf die der Phenolase den gleichen Einfluß ausüben, wie normale Sera. Eine ähnliche Beobachtung ist in bezug auf die Ureasewirkung bereits von *Jacoby* und seinen Mitarbeitern gemacht worden.

Fassen wir die im obigen mitgeteilten Tatsachen zusammen, so ergibt sich folgendes:

Normales Serum der Säugetiere, welches auf die Perhydridase und die Urease fördernd wirkt, übt auf die durch die Phenolase ausgelösten Oxydationsprozesse bald einen fördernden, bald einen hemmenden Einfluß aus, je nachdem das Oxydationsoptimum der angewandten Substrate bei alkalischer oder bei saurer Reaktion liegt. In gepufferten Lösungen oder durch vorsichtigen Zusatz von Säure wird sowohl die fördernde, wie die hemmende Wirkung des Serums aufgehoben. Daraus drängt sich der Schluß auf, daß man es in bezug auf die Phenolasewirkung hier nicht mit etwaigen Auxo- und Anti-Substanzen des Serums zu tun hat, sondern mit dessen Fähigkeit, H-Jonen abzufangen und die Reaktion der Versuchsflüssigkeit derartig abzuändern, daß die neuen Verhältnisse sich für die Oxydation einer Substratgruppe günstig, für die Oxydation einer anderen

Substratgruppe ungünstig gestalten. Daß die Wirkung der drei genannten Fermente durch verschiedene Proteinstoffe in gleicher Weise, wie durch Serum, beeinflußt wird, spricht ebenfalls gegen die Annahme, daß in letzterem auf diese Fermente eingestellte Auxosubstanzen anwesend seien.

Bei der Beurteilung der Beeinflussung der Fermentwirkung durch Serumzusätze hat man weiter den Salzgehalt des Serums zu berücksichtigen, da bekanntlich Salze eine wichtige Rolle bei den Fermentreaktionen spielen. In Betracht kommen schließlich die physikalischen Eigenschaften des Serums. Durch Serumzusätze, wie gering sie auch sein mögen, werden in der Versuchsflüssigkeit Adsorptionserscheinungen ausgelöst, durch welche die obwaltenden Verhältnisse im günstigen oder ungünstigen Sinne für die gegebene Reaktion abgeändert werden, wodurch wiederum auxo- oder anti fermentative Wirkungen vorgetäuscht werden.

Ehe man also zu der Annahme von spezifischen auxo- oder anti fermentativen Substanzen im Serum zurückgreift, ist es unbedingt erforderlich, dem Einfluß der erwähnten Faktoren — der Puffer-eigenschaft des Serums, seines Salzgehaltes und seiner kolloiden Beschaffenheit — gute Rechnung zu tragen.

Über Antiphenolase (Antilakkase).

Von

A. Bach und W. Engelhardt.

(Aus dem biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit
in Moskau.)

(Eingegangen am 9. Oktober 1922.)

Von *Gessard*¹⁾ wurde die Beobachtung gemacht, daß nach subkutanem Einspritzen von Lakkaselösung (einem Kaninchen) im Serum des Tieres nach einiger Zeit eine Antilakkase auftritt. Die Anwesenheit von letzterer wurde durch qualitative Versuche mit Guajakharzemulsion und Guajakol festgestellt, wobei das Immunserum unter sonst gleichen Bedingungen eine größere Hemmung der Oxydation als das Normalserum herbeiführte.

Mit Rücksicht auf die Erkenntnis der scheinbaren auxo- und antifermentativen Eigenschaften des Serums der Phenolasewirkung gegenüber (vgl. voranstehende Mitteilung) schien es von Interesse, die Beobachtung *Gessards* nachzuprüfen und auf andere Substrate auszu dehnen.

Da das Oxydationsoptimum des Guajakols und der Guajakharzemulsion bei saurer Reaktion liegt, war es besonders wichtig, Substrate heranzuziehen, deren Oxydationsoptimum bei alkalischer Reaktion liegt, zumal die Oxydation dieser Substrate durch Normalsera stark befördert wird.

Für die im nachstehenden beschriebenen Versuche benutzten wir eine Phenolaselösung aus Pilzen (*Lactarius vellereus*), von der 10 ccm mit 2,5 g Pyrogallol in 40 ccm zusammengebracht nach 24 Stunden langem Stehenlassen 0,046 g Purpurogallin lieferten. Je 2 bis 3 ccm Phenolaselösung wurden Kaninchen in die Ohrvene in Intervallen von 5 bis 6 Tagen eingespritzt. Zeigte nach sechs Injektionen das Serum der Versuchstiere das gleiche Verhalten wie das Serum normaler Tiere, so wurde die Behandlung abgestellt und dann nach 2 bis 3 Wochen wieder vorgenommen. In dieser Weise wurden sieben Kaninchen immu-

¹⁾ C. r. Soc. biol. 55, 227, 1903.

nisiert. Unter den Seren dieser Versuchstiere zeigten 4 ziemlich starke, 2 schwache und 1 gar keine Antiphenolasewirkung, unabhängig von der Natur der Substrate und der eigenen Wasserstoffionenkonzentration der Sera.

Einfluß der Immunsera auf die Oxydation des Guajakols in gepufferten Lösungen.

Die Versuche wurden mit den Seren von vier immunisierten und zehn normalen Kaninchen ausgeführt. Zur Ausschaltung der Puffer-eigenschaften der Sera wurden die Versuchsflüssigkeiten nach *Michaelis* mit Essigsäure und Natriumacetat in der Weise gepuffert, daß $[H^+]$ $2,5 \times 10^{-6}$ betrug. Die Versuchsanordnung war die folgende:

1 ccm 0,1proz. Guajakollösung, 2 ccm Pufferlösung, 0,1 ccm Phenolase-lösung und 0,1 ccm Serum wurden im Erlenmeyerkölbchen mit Wasser auf 10 ccm gebracht und nach 1 Stunde langem Stehenlassen wurde im Gemisch das oxydierte Guajakol nach *Bach* und *Zubkova*¹⁾ kolorimetrisch bestimmt, wobei anstatt der Röhrenskala das *Autenrieth'sche* Keilkolori-meter angewandt wurde. In dieser Weise wurden folgende Resultate erhalten:

		Oxydiertes Guajakol in mg									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Normalsera	. .	0,133	0,122	0,108	0,111	0,116	0,130	0,110	0,110	0,119	0,116
Immunsera	. .	0,059	0,052	0,062	0,058	—	—	—	—	—	—
Mittelzahlen		{ Normalsera 0,115 Immunsera 0,057 Ohne Serumzusatz 0,119									

Während also der Zusatz von Normalseren auf die Oxydation des Guajakols ohne Einfluß ist, wirkt der Zusatz von Immunseren hemmend, und zwar beträgt die Hemmung etwa 50% des Umsatzes.

Einfluß der Immunsera auf die Oxydation des Pyrogallols.

Als Vertreter der Substratgruppe, deren Oxydationsoptimum bei alkalischer Reaktion liegt, wurde das Pyrogallol, dessen Oxydationsprodukt sich genau bestimmen läßt, gewählt.

0,1 g Pyrogallol, 2 ccm Pufferlösung, 0,2 ccm Serum, 0,1 ccm Phenolaselösung, mit Wasser auf 10 ccm gebracht, wurden im Erlenmeyerkolben 24 Stunden stehen gelassen und das entstandene Purpurogallin wurde dann nach *Bach* und *Sbarsky*²⁾ auf Asbest abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser Kaliumpermanganat nicht mehr reduzierte, in konzentrierter Schwefelsäure quantitativ gelöst, die schwefelsaure Lösung wurde mit Wasser auf das Siebenfache verdünnt und mit

¹⁾ Diese Zeitschr. 1921.

²⁾ Diese Zeitschr. 84, 473, 1911.

n/10 Kaliumpermanganatlösung bis zu bleibender Rosafärbung titriert. Zur Beschleunigung der Einstellung des Endzustandes wurde am Abschluß der Titration die Versuchsflüssigkeit zum Sieden erhitzt. In folgender Tabelle sind die erhaltenen Resultate angegeben:

	Verbrauchte Kaliumpermanganatlösung in ccm		
	1	2	Mittelzahlen
Normalsera	3,45	4,10	3,76
Immunsera	2,20	2,20	2,20
Ohne Serumzusatz	3,3	3,8	3,52

Normalsera	6,35	5,80	6,07
Immunsera	2,75	2,85	2,80
Ohne Serumzusatz	3,65	3,60	3,62

In nicht gepufferten Lösungen wurden unter sonst gleichen Bedingungen nachstehende Zahlen ermittelt:

Immunsera wirken demnach auf die Oxydation des Pyrogallols hemmend nicht nur in gepufferten Lösungen, sondern auch in nicht gepufferten, in welchen Normalsera eine beträchtliche Förderung der Oxydation herbeiführen.

Diese Ergebnisse, die in mehreren Versuchen bestätigt wurden, lassen erkennen, daß Sera mit Phenolaselösung behandelter Tiere eine hemmende Wirkung zeigen sowohl auf die Oxydation der Substrate, deren Oxydationsoptimum bei saurer Reaktion, wie auf die Oxydation der Substrate, deren Oxydationsoptimum bei alkalischer Reaktion liegt, worin Immunsera sich scharf von Normalseren unterscheiden.

Die antiphenolatische Wirkung der Immunsera könnte in erster Linie durch eine bei der Immunisation eintretende Änderung ihrer Puffereigenschaften erklärt werden. Aber abgesehen davon, daß eine derartige Änderung bisher nicht festgestellt werden konnte, spricht gegen diese Annahme die Tatsache, daß die Hemmung sich in nicht gepufferten wie in gepufferten Lösungen äußert, also nicht auf einer Änderung der Reaktion der Versuchsflüssigkeit beruht.

Der Einfluß des Salzgehaltes der Immunsera kommt hier ebenfalls nicht in Betracht, da einerseits ein Unterschied zwischen dem Salzgehalt der Normalsera und der Immunsera nicht festzustellen ist, andererseits Immunsera gleich stark hemmend auf die Oxydation verschiedener Substrate wirken, was mit der Annahme eines Unterschiedes im Salzgehalt unvereinbar ist¹⁾.

Von den in voranstehender Mitteilung besprochenen Faktoren, welche scheinbare auxo- und antifermentative Wirkungen des Serums

¹⁾ Diese Zeitschr. 42, 417, 1912.

herbeiführen mögen, bleibt noch ein etwaiger Unterschied in der physikalischen Beschaffenheit zwischen Normalseren und Immunseren zu berücksichtigen. Die Frage bedarf einer eingehenden Experimentalbearbeitung und zurzeit ist nicht zu entscheiden, ob die Antiphenolasewirkung durch eine eigenartige physikalische Beschaffenheit der Immunsera oder durch das Auftreten eines echten, chemisch definierten Antikörpers verursacht wird. Die Antiphenolase teilt diese Unsicherheit mit manchen anderen Antikörpern. Ihr Verhalten bei der Dialyse stimmt ebenfalls mit dem Verhalten anderer Antikörper überein. Das gleiche gilt auch für ihre Empfindlichkeit gegen höhere Temperaturen.

Verhalten der Antiphenolase bei der Dialyse.

Auf das 10fache mit Wasser verdünntes Immunserum wurde der Dialyse gegen destilliertes Wasser in *Schleicherschen* Hülzen unterworfen, bis die äußere Flüssigkeit keine Reaktion auf Chlor mehr gab. Gleichzeitig wurde auch Normalserum dialysiert. Unter Zusatz von dialysiertem und nicht dialysiertem Normalserum einerseits, von dialysiertem und nicht dialysiertem Immunserum andererseits wurden vergleichende Oxydationsversuche mit Guajakol und Phenolase in gepufferten und nicht gepufferten Lösungen angestellt. Erhalten:

	Oxydiertes Guajakol in mg				
	Immunserum		Normalserum		Ohne Serum-zusatz
	dialysiert	nicht dialysiert	dialysiert	nicht dialysiert	
Mit Puffer	0,078	0,078	0,205	0,191	0,213
Ohne Puffer	Spur	Spur	0,047	0,031	0,130

Das dialysierte Immunserum weist also die gleiche hemmende Wirkung wie das nicht dialysierte auf. Demnach haftet die Antiphenolasewirkung an dem nicht dialysierbaren Anteil des Immunserums.

Hitzeempfindlichkeit der Antiphenolase.

Von *Gessard* wurde bereits festgestellt, daß durch Erhitzen des Immunserums auf 60° während 30 Minuten die Antiphenolase noch nicht zerstört wird. Diese Beobachtung konnten wir bestätigen und dahin erweitern, daß die Antiphenolase erst nach 30 Minuten langem Erhitzen auf etwa 80° völlig vernichtet wird, wobei das so behandelte Immunserum in weiterem sich genau wie das Normalserum verhält. Die Versuche wurden mit Guajakol in gepufferten Lösungen ausgeführt.

	Oxydiertes Guajakol in mg Nach 30 Minuten langem Aufbewahren bei		
	15° C	70° C	85° C
Immunserum	0,053	0,064	0,108
Normalserum	0,108	0,113	0,110
Ohne Serumzusatz	0,116	—	—

Antiphenolasewirkungen der zum Sieden erhitzten Sera.

Erhitzt man zum Sieden bei 80° völlig inaktiviertes Immunserum, so gewinnt es starke antiphenolatische Eigenschaften wieder. Normalsera zeigen das gleiche Verhalten, wobei die Antiphenolasewirkung auch in gepufferten Lösungen zustande kommt.

Guajakol, Phenolase, Puffer, erhitztes und nicht erhitztes Serum. Die Reaktion wurde während 2 Stunden verfolgt.

	Oxydiertes Guajakol in mg Nach Verlauf von			
	30'	60'	90'	120'
Nicht erhitztes Serum	0,062	0,112	0,150	0,188
Erhitztes Serum . .	—	0,038	0,050	0,082
Ohne Serumzusatz .	0,072	0,134	0,166	0,194

Diese auffallende Eigenschaft der Sera, nach Erhitzen zum Sieden auf die Phenolase in gepufferten Lösungen hemmend zu wirken, schien zunächst mit den antiphenolatischen Eigenschaften des Immunserums in irgend einem Zusammenhang zu stehen. Weitere Versuche ergaben aber, daß dies nicht der Fall ist.

Um festzustellen, ob die hemmende Wirkung dem Eiweißanteil oder dem eiweißfreien Anteil des Serums zukommt, wurde eine bestimmte Serummenge mit Alkohol gefällt, der Niederschlag wurde mit Alkohol nachgewaschen, getrocknet und im ursprünglichen Volumen Wassers gelöst. Andererseits wurde das gesamte alkoholische Filtrat bei 40° eingedampft, und der erhaltene Rückstand wurde ebenfalls zum ursprünglichen Serumvolumen in Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden dann zum Kochen erhitzt und auf ihre antiphenolatische Wirkung geprüft, wobei nur der Eiweißanteil des Serums einen hemmenden Einfluß ausübte.

Es zeigte sich weiter, daß zum Sieden erhitzte Lösungen von reinem Serumalbumin und Eialbumin auf die durch die Phenolase ausgelösten Oxydationsprozesse ebenso hemmend wie gekochte Sera wirken. Um den etwaigen Einfluß der Reaktion der Eiweißlösung auf das Zustandekommen der Hemmung zu ermitteln, wurden gleiche Mengen Eiweißlösung, die eine mit Natronlauge, die andere mit Salz-

säure in äquivalenten Mengen erhitzt. Nach Erkalten wurden beide Proben sorgfältig neutralisiert und in gepufferten Lösungen auf ihre hemmenden Wirkungen geprüft. Als aktiv erwies sich nur die mit Natronlauge erhitzte Probe, die andere war völlig wirkungslos.

Da beim Erhitzen der Eiweißstoffe mit Alkalien Schwefelwasserstoff abgespalten wird, so lag die Vermutung nahe, daß die Hemmung der Phenolasewirkung durch gekochte Eiweißlösungen oder Sera dem Schwefelwasserstoff oder dem Schwefelnatrium zuzuschreiben sei. Diese Vermutung hat sich bestätigt. Wird dem Gemisch von Guajakol- oder Pyrogallollösung und Phenolase, Schwefelwasserstoff oder Natriumsulfid zugesetzt, so werden die gleichen Hemmungserscheinungen, wie mit gekochten Seren oder Eiweißlösungen, beobachtet. Die Hemmung wird hier nicht durch die Schädigung der Phenolase, sondern lediglich durch die Reduktion der Oxydationsprodukte bewirkt. Denn nach Verbrauch der Schwefelverbindungen verläuft der Oxydationsprozeß weiter in normaler Weise.

Der hemmende Einfluß der Schwefelverbindungen läßt sich leicht durch vorsichtigen Zusatz von Jod oder Quecksilberchlorid beseitigen. In gleicher Weise wird auch die Antiphenolasewirkung der gekochten Sera aufgehoben. Es sei noch erwähnt, daß die Anwesenheit von Schwefelwasserstoff in erhitzten Seren leicht mit Dimethylpara-phenylendiamin und Ferrichlorid (*Fischersche Reaktion*) nachgewiesen werden kann; in nicht erhitzten Seren bleibt die Reaktion aus.

Obige, durch zahlreiche Versuche festgestellte Tatsachen lassen erkennen, daß die Antiphenolasewirkung der Immunsera und die hemmende Wirkung der gekochten Sera grundsätzlich voneinander verschieden sind. Letzterer liegt die reduzierende Eigenschaft des beim Erhitzen der Sera abgespaltenen Schwefelwasserstoffs zugrunde. Im nicht gekochten Immunserum ist dagegen die Anwesenheit von Schwefelwasserstoff nicht nachweisbar. Die hemmende Wirkung der erhitzten Sera kann durch Zusatz von Jod oder Quecksilberchlorid aufgehoben werden. Die gleichen Zusätze sind auf die Antiphenolase des nicht erhitzten Immunserums ohne jeden Einfluß. Die Antiphenolasewirkung der Immunsera läßt sich also auf keine der bisher bekannten, scheinbaren Antiphenolasewirkungen zurückführen.

Zusammenfassung.

Die von *Gessard* auf Grund qualitativer Versuche mit Guajakharzemulsion und Guajakol angenommene Bildung einer Antiphenolase im Serum mit Phenolaselösung behandelter Kaninchen wird durch quantitative Versuche bestätigt und auf Substrate, deren Oxydationsoptimum bei alkalischer Reaktion liegt, ausgedehnt.

Das Serum mit Phenolase behandelter Tiere wirkt auch hemmend auf die Oxydation der Substrate, deren Oxydation durch Normalsera stark befördert wird.

Die Antiphenolasewirkung der Immunsera kommt auch in gepufferten Lösungen zustande. Sie kann daher nicht auf eine Änderung der Puffereigenschaften der Sera der immunisierten Tiere zurückgeführt werden.

Ob die Antiphenolasewirkung durch eine Änderung der physikalischen Eigenschaften der Immunsera oder durch das Auftreten eines echten, chemisch definierten Antikörpers herbeigeführt wird, bleibt dahingestellt.

Die Antiphenolasewirkung haftet an dem nicht dialysierbaren Anteil des Serums. Sie wird durch 30 Minuten langes Erhitzen auf etwa 80° völlig zerstört.

Zum Sieden erhitzte Normal- und Immunsera wirken auf die durch die Phenolase ausgelösten Oxydationsprozesse stark hemmend. Die Hemmung macht sich sowohl in gepufferten, wie in nicht gepufferten Lösungen geltend und wird also nicht durch eine Änderung der Reaktion der Versuchsflüssigkeit verursacht. Zum Sieden erhitzte Lösungen von Serumalbumin und Eieralbumin bedingen die gleiche Hemmung der Oxydationsprozesse. Es wird festgestellt, daß diese Hemmung durch beim Erhitzen der Eiweißlösungen abgespaltenen Schwefelwasserstoff bewirkt wird. Letzterer ist in erhitzten Seren und Eiweißlösungen mit Dimethylparaphenylendiamin und Ferri-chlorid nach *Fischer* nachweisbar. Durch Zusatz von Jod oder Quecksilberchlorid läßt sich die hemmende Wirkung der erhitzten Sera und Eiweißlösungen beseitigen. Die Antiphenolasewirkung der Immunsera hat mit der hemmenden Wirkung der erhitzten Sera nichts zu schaffen, da erstere nicht durch Zusatz von Jod oder Quecksilberchlorid aufgehoben wird. In nicht erhitzten Immunseren ist Schwefelwasserstoff nicht nachweisbar.

Die Antiphenolasewirkung der Immunsera läßt sich auf keine der bisher bekannten, scheinbaren Antiphenolasewirkungen zurückführen.

Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferrieyanid.

Von

H. C. Hagedorn und B. Norman Jensen (Kopenhagen).

(Aus dem Privatlaboratorium des Verfassers.)

(Eingegangen am 13. Oktober 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Mikromethode zur Blutzuckerbestimmung von *Ivar Bang*¹⁾ hat durch ihre relative Genauigkeit, geringen Materialverbrauch sowie ihre Schnelligkeit eine neue Epoche in der Diabetesforschung eingeleitet. Allerdings geht aus zahlreichen Publikationen, nicht am wenigsten von *Bang* und seinen Schülern, hervor, daß die Methode doch einige Nachteile haben muß; eine durchaus zufriedenstellende Methode würde wohl kaum bis zu einem Dutzend Modifikationen erleben.

Infolge von *Schwierigkeiten mit Bangs erster Methode* haben wir das Problem der Mikrozuckerbestimmung vom Grunde aus angegriffen und eine ganz neue Methode, welche wir bereits früher kürzlich in Dänemark publizierten²⁾, ausgearbeitet. In den seither verflossenen Jahren haben wir durch Ausführung vieler Tausend Analysen die Genauigkeit und Schnelligkeit der Methode bestätigt sehen können, weshalb wir hier die Methode wie deren theoretische Grundlage beschreiben.

Es war von vornherein klar, daß das Problem wesentlich vereinfacht würde, falls man zur Oxydation des Zuckers einen Stoff benutzte, der einmal von Zucker reduziert sich unter gewöhnlichen Bedingungen nicht wieder zurückoxydierte. Nach vielen vergeblichen Experimenten, besonders mit organischen Farbstoffen, deren Verwendung deshalb vorteilhaft schien, weil sie bekanntlich nur eine kleine Restreduktion aufweisen, haben wir schließlich das Kaliumferrieyanid als Oxydationsmittel gewählt.

Die Anwendung des Kaliumferrieyanids zur Zuckerbestimmung ist ursprünglich von *Gentile*³⁾ in der Weise vorgeschlagen, daß man zur ab-

¹⁾ *Ivar Bang*, Der Blutzucker, S. 26. Wiesbaden 1913.

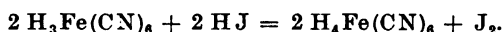
²⁾ *Hagedorn und Norman Jensen*, Ugeskrift for Læger Nr. 31, 1918.

³⁾ Chem. Centralbl. (2) 82, 504.

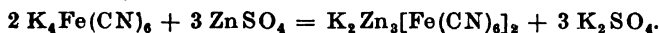
gemessenen, erwärmten, alkalischen Ferricyanidlösung die zu bestimmende Zuckerlösung zutropfte bis zum Verschwinden der gelben Ferricyanidfarbe. Diese Versuchsanordnung ist für eine Mikromethode aus mehreren Gründen ungeeignet und kann durch Anwendung des ursprünglich von Märker¹⁾ angegebenen Prinzips: Oxydation des Zuckers durch ein in Überschuß anwesendes Oxydationsmittel und Bestimmung des Überschusses nach Ablauf des Prozesses, sehr verbessert werden.

Es ist von vornherein gleichgültig, ob man die gebildete Ferrocyanidmenge oder die zurückgebliebene Ferricyanidmenge bestimmt. Für die Bestimmung des gebildeten Ferrocyanids sind untersucht 1. kolorimetrische Methoden nach Umwandlung des Ferrocyanids in Ferri- oder Uraniferrocyanid; 2. Titrierung mit Kaliumpermanganat nach *de Haen*²⁾; 3. verschiedene Formen von jodometrischer Titrierung. Für die Bestimmung des Ferricyanids ist untersucht worden: Titrierung mit Hydroxylamin und schließlich eine jodometrische Titrierung, welche durch ihre Einfachheit und Genauigkeit die oben genannten, zum Teil ganz unverwendbaren Methoden weit übertroffen hat. Die Methode zur jodometrischen Bestimmung des Ferricyanids ist von *C. Mohr*³⁾, *Müller* und *Diefenthaler*⁴⁾, sowie *Mecklenburger*⁵⁾ ausgearbeitet.

Die folgende Gleichung erläutert die Reaktion:



Der Prozeß ist reziprok, verläuft aber quantitativ zur Bildung von Ferrocyanid und Jod, wenn das gebildete Ferrocyanid vom Reaktionsgemisch durch Fällung als Zinkverbindung entfernt wird.



Für unseren Zweck hat sich als die Beste die Titrierung in essigsaurer Lösung erwiesen.

Nach orientierenden Untersuchungen wurde eine Ferricyanidmenge von 2 ccm 0,005 n Lösung passend befunden. Die Genauigkeit, mit welcher eine solche Ferricyanidmenge bestimmt werden kann, geht aus folgendem Versuch hervor:

Von einer genau 0,005 n Ferricyanidlösung werden mittels einer Mikrobürette verschiedene Mengen abgemessen. Das Volumen wird auf 14 ccm mit Wasser ergänzt, und zu jeder Portion werden 3 ccm einer Lösung von Kaliumjodid 5 g, Zinksulfat 10 g, Natriumchlorid 50 g, in Wasser bis 200 ccm, zugesetzt. Nach Mischung werden weiter 2 ccm etwa 3proz. Essigsäure zugesetzt und schließlich mit 0,005 n Natriumthiosulfatlösung titriert. Als Indikator werden zwei Tropfen einer Lösung von löslicher Stärke 1 g in gesättigter, wässriger Natriumchloridlösung bis 100 ccm benutzt.

1) Zeitschr. f. anal. Chem. 18, 348.

2) Ann. d. Chem. 90, 160.

3) Ann. d. Chem. u. Pharm. 105, 60.

4) Zeitschr. f. anorg. Chem. 87, 433.

5) Ebendasselbst 67, 324.

Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle I.

Abgemessen n/5000 ccm Kalium- ferricyanid		Gefunden	
0,10	0,10	0,10	0,10
0,20	0,20	0,20	0,20
0,40	0,40	0,40	0,40
1,00	1,00	1,00	1,01
2,00	2,01	1,99	2,01

Wenn es gilt, die Reduktion des Ferricyanids durch Zucker zur Bestimmung desselben zu benutzen, hat man zuerst zu erwägen, unter welchen Bedingungen der Prozeß vor sich gehen muß. Ferner müssen die Bedingungen so gewählt werden, daß eine geringe Änderung derselben den Prozeß nicht oder doch wenig möglichst beeinflußt. Erst wenn diese Bedingungen herausgefunden sind, ist einmal für alle die Relation zwischen anwesender Glucose und reduziertem Ferricyanid zu ermitteln. Folgende Umstände kommen bei der Wahl der Versuchsbedingungen in Betracht:

1. Die Ferricyanidmenge.
2. Die Alkalinität der Lösung,
3. Die Erhitzung,
4. Das Volumen des Reaktionsgemisches.

Zu 1. Durch orientierende Versuche hat sich die Ferricyanidmenge in 2 ccm 0,005 n Kaliumferricyanidlösung als am zweckmäßigsten erwiesen.

Zu 2. Nach Untersuchungen von G. Kassner¹⁾ sind hydroxydalkalische Ferricyanidlösungen wenig beständig. Für unseren Zweck ist daher die carbonatalkalische Lösung gewählt. Den Einfluß der Variationen der Alkalimenge erläutern die folgenden Versuche (Tabelle II).

Zu 3. Um eine bequeme, leicht definierbare Erhitzung zu erzielen, wird ein kochendes Wasserbad benutzt. Der Einfluß der Variationen der Erhitzungsdauer geht aus den folgenden Versuchen hervor (Tabelle II).

Es werden die Versuche in folgender Weise ausgeführt:

In kleine sogenannte Präparatengläser (30 × 90 mm) wird die betreffende Glucose- und Natriumcarbonatlösung abpipettiert, das Volumen auf 12 ccm ergänzt und endlich 2 ccm 0,005 n Kaliumferricyanidlösung zugesetzt. Nach Erhitzung in kochendem Wasserbade und Abkühlung werden 3 ccm Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung sowie 2 ccm Essigsäure zugesetzt und danach in oben beschriebener Weise mit Natriumthiosulfatlösung titriert. Die Ergebnisse waren:

¹⁾ Arch. d. Pharm. 234, 333.

Tabelle II.

Einfluß von Änderungen in Erhitzungsdauer und Alkalikonzentration.

Erhitzungsdauer Minuten	Verbraucht ccm 0,005 n Kaliumferricyanid								
	etwa 0,07 mg Glucose			etwa 0,20 mg Glucose			etwa 0,35 mg Glucose		
10	0,32	0,36	0,38	1,04	1,08	1,11	1,66	1,76	1,80
	0,34	0,38	0,40	1,06	1,08	1,11	1,67	1,77	1,81
15	0,40	0,40	0,40	1,14	1,13	1,12	1,84	1,84	1,83
	0,42	0,40	0,41	1,12	1,13	1,12	1,84	1,84	1,84
20	0,42	0,41	0,40	1,13	1,13	1,12	1,85	1,85	1,85
	0,40	0,40	0,40	1,12	1,13	1,12	1,86	1,86	1,85
ccm Na ₂ CO ₃ m/10	1,5	2,0	2,5	1,5	2,0	2,5	1,5	2,0	2,5

Zu 4. Der Einfluß des Volumens des Reaktionsgemisches wird durch folgende Versuche, in welchen vier verschiedene Glucosemengen untersucht wurden, erläutert. Für jeden Einzelversuch werden 2 ccm 0,005 n Kaliumferricyanidlösung und 2 ccm m/10 Na₂CO₃ abgemessen; die gewünschte Glucosemenge wird in passender Lösung zugesetzt und das Volumen ergänzt, wonach das ganze Gemisch 15 Minuten in kochendem Wasserbade erhitzt wird.

Nach Abkühlung wird nach Zusatz der Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung sowie Essigsäure mit Natriumthiosulfatlösung titriert.

Tabelle III.

Einfluß von Änderungen im Volumen des Reaktionsgemisches.

Volum ccm	Verbraucht ccm 0,005 n Kaliumferricyanid			
	etwa 0,009 mg Glucose	etwa 0,225 mg Glucose	etwa 0,300 mg Glucose	etwa 0,360 mg Glucose
12	0,50	1,27	1,65	1,92
	0,50	1,26	1,64	1,92
14	0,50	1,27	1,64	1,91
	0,51	1,27	1,65	1,91
16	0,50	1,26	1,61	1,89
	0,50	1,26	1,61	1,88

Auf Grund der in Tabellen II und III angeführten Ergebnisse wurden folgende Standardversuchsbedingungen für die Zuckerbestimmung gewählt:

Die Glucose wird mit 2 ccm 0,005 n Kaliumferricyanidlösung, 2 ccm n/10 Natriumcarbonatlösung und Wasser bis 14 ccm 15 Minuten in siedendem Wasserbade erhitzt. Dabei ist zu erwarten, daß die Messungen bis auf etwa 0,01 ccm 0,005 n Kaliumferricyanidlösung reproduzierbar sein werden.

Noch haben wir uns über einige andere eventuelle Fehlerquellen zu orientieren:

1. Das Licht.

Direktes Sonnenlicht wirkt destruierend auf alkalische Ferricyanidlösung ein; zerstreutes Tageslicht dagegen hatte auf die Lösung, die an einem schönen Junitag dicht ans Fenster gestellt war, binnen 30 Minuten keinen meßbaren Einfluß. Die durch Licht bedingten Fehler lassen sich demnach leicht beherrschen.

2. Rückoxydation des Ferricyanids.

Weder in alkalischer noch in schwach essigsaurer Lösung tritt binnen einigen Stunden meßbare Oxydation des Ferrocyanids ein. Die betreffenden Versuche sind teils mit reiner Ferrocyanidlösung, teils mit durch Glucose teilweise reduzierter Ferricyanidlösung ausgeführt.

Die Menge von Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung sowie Essigsäure, konnte ohne nachweisbare Änderung der Resultate bis um 100% vermehrt werden.

Auch das Stehenlassen des Reaktionsgemisches nach dem Zusatz der Reagenzien bis zu einer Stunde war nicht von merkbarem Einfluß.

Es erübrigt nun ein für allemal, die Relation zwischen Glucose und reduziertem Ferricyanid unter den erwähnten Bedingungen zu ermitteln.

Bei allen bisher angeführten Versuchen ist nur eine relative Genauigkeit gefordert worden, weil es sich nur um vergleichende Untersuchungen handelte. Anders stellt sich die Sache, wo absolute Zahlen erforderlich sind. Die Forderung an Reinheit der Reagenzien muß aufs höchste gespannt werden. So wurde das umkristallisierte Natriumcarbonat in geschlossenem Platintiegel geglüht. Kaliumjodid wurde auf Jodat und Eisen, Zinksulfat-Natriumchlorid und Essigsäure auf Eisen sorgfältig geprüft. Weiter überzeugte man sich als Kontrolle davon, daß die genannten Reagenzien in passenden Verhältnissen gemischt mit Stärke keine Reaktion auf Jod gaben, und daß eine solche kräftig hervortritt beim Zusetzen von 0,01 ccm 0,005 n Kaliumferricyanidlösung.

Kaliumferricyanid wurde als tadellose Handelsware eingekauft, mit kaltem Wasser abgespült und in heißem Wasser gelöst; die kochend heiße Lösung wurde durch ein kleines, vorher mit kochendem Wasser sorgfältig ausgewaschenes Filter gegossen und das Filtrat in einer Porzellanschale, die auf eiskaltem Wasser schwamm, aufgefangen. Das feine Kristallmehl wurde scharf abgenutscht, wobei wieder ein sorgfältig ausgewaschenes Filter zur Verwendung kam, und wieder umkristallisiert. Schließlich wurde das Endprodukt bei etwa 50° getrocknet. Der ganze Prozeß wurde bei künstlichem Licht ausgeführt. Das Präparat verlor im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure binnen 24 Stunden weniger als 0,05%.

Infolge der Darstellungsweise des Präparats mußte man auf ein eventuelles Vorkommen von Ferrisalzen oder Ferrocyanid gefaßt sein. Zum Nachweis von eventuell anwesenden Ferrisalzen wurden 5 ccm

etwa 1proz. Ferricyanidlösung mit 1 Tropfen 10proz. Schwefelsäure und einigen Tropfen Ferrocyanidlösung versetzt; hierdurch zeigte sich keine Spur von Berlinerblau. Kontrollversuche haben gelehrt, daß die Probe bei Anwesenheit von 0,01 mg Fe positiv ist. Auf Ferrocyanid wurde in der Weise geprüft, daß einige Kubikzentimeter Ferricyanidlösung mit einigen Tropfen frisch hergestellter Ferrichloridlösung und einigen Tropfen Salzsäure versetzt wurden; auch hierbei wurde kein Berlinerblau wahrgenommen. Angestellte Kontrollversuche haben gezeigt, daß die Reaktion deutlich positiv ist bei Anwesenheit von 0,02 mg $K_4 Fe (CN)_6$. Ferner wurde die Reinheit des Präparats in folgender Weise sozusagen direkt festgestellt. Eine etwa 0,05 n Natriumthiosulfatlösung] wird in gewöhnlicher Weise hergestellt und aufbewahrt. Der Titer wurde nach drei verschiedenen Methoden ermittelt: 1. Jod gegenüber nach *Treadwell*¹⁾; 2. einer sorgfältig hergestellten Kaliumjodatlösung gegenüber und 3. endlich Ferricyanid gegenüber in der Weise, daß 10 ccm einer 0,05 n Ferricyanidlösung mit 10 ccm von der oben angegebenen Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung und 3 ccm 50proz. Essigsäure versetzt wurden, wonach in gewöhnlicher Weise titriert wurde. Die ermittelte Normalität der Thiosulfatlösung war mit Kaliumferricyanid 0,04949, mit Kaliumjodid 0,04947 und mit Jod 0,04949.

Die angewendete Glucose bildete dünne Krusten von kleinen, harten, glänzenden Kristallen, die bei Verbrennung eines Grammes keinen wägbaren Rückstand hinterließ, und im Vakuum bei 70° bis zur Gewichtkonstanz getrocknet war, wonach eine Lösung, die in 22,838 g 1,3912 g Glucose enthielt, hergestellt wurde. Die Lösung wurde vor der Wägung 2 Stunden in siedendem Wasserbade erhitzt, um die Multirotation zu beseitigen. Die Lösung wurde danach im 20 cm-Rohr bei 21,5° in spektralreinem Licht polarisiert, wobei folgende Werte beobachtet wurden:

6,55, 6,56, 6,55, 6,56, 6,55, 6,56, 6,56, 6,55.

Durchschnitt 6,555°.

Das spezifische Gewicht der Lösung wurde mit dem Pyknometer ermittelt

$$D \frac{20^{\circ}}{4^{\circ}} = 1,0223.$$

Aus der beobachteten Drehung wurde berechnet:

$$[\alpha]_D^{21,5} = 52^{\circ} \cdot 67.$$

Nach der Formel von *Tollens, Landolt-Börnstein*²⁾, berechnet sich:

$$[\alpha]_D = 52^{\circ} \cdot 63 \quad (t = 20^{\circ}; p = 6,09).$$

¹⁾ *Treadwell*, Kurzes Lehrb. d. anal. Chem., 7. Aufl., 2, 549. Leipzig und Wien 1917.

²⁾ *Tollens, Landolt-Börnstein*, Physik.-chem. Tabellen, 4. Aufl., Tabelle 228b, S. 1054. Berlin 1912.

Bei allen Reduktionsmethoden zur Zuckerbestimmung macht es sich störend geltend, daß das Oxydationsmittel auch ohne Anwesenheit der Glucose teilweise reduziert wird. Diese sogenannte Eigenreduktion oder Blindwert ist auch bei der Ferricyanidmethode unvermeidlich. Dieser Blindwert beruht unserer Meinung nach auf mehreren verschiedenen Ursachen. Eine von diesen ist die Anwesenheit von Mikroorganismen; so wird die Eigenreduktion groß gefunden werden, wenn man destilliertes Wasser, das unter gewöhnlichen Bedingungen längere Zeit aufbewahrt ist, benutzt. Ferner haben wir mehrmals beobachtet, daß frisch destilliertes Wasser eine eben beobachtbare Reduktion des Ferricyanids, und zwar selbst in der Kälte bewirkt, während Wasser, das einige Tage im Eisschrank aufbewahrt gewesen ist, keine solche Wirkung aufweist. Deshalb haben wir angenommen, daß in frisch destilliertem Wasser eine winzige Spur von Wasserstoffsuperoxyd vorkomme. Früher hatte man den Blindwert, das heißt die Menge von Oxydationsmittel, die in einem Blindversuch reduziert wird, als Korrektion derart berechnet, daß man von dem im eigentlichen Versuch gefundenen Verbrauch an Oxydationsmittel den betreffenden Blindwert subtrahiert. Eine solche Berechnung ist nur erlaubt, wenn der Verbrauch an Oxydationsmittel mit der anwesenden Glucosemenge proportional ist. Dies ist aber meistens, so auch bei der Ferricyanidmethode, nicht der Fall. Wir haben den Blindwert als Glucose zu berechnen vorgezogen, welches dadurch möglich wird, daß die reduzierte Ferricyanidmenge mit der anwesenden Glucosemenge proportional ist, sobald es sich um kleine Glucosemengen handelt.

Um die Relation zwischen anwesender Glucose und reduziertem Ferricyanid zu ermitteln, wurden 0,2000 g Glucose in Wasser bis 1 Liter gelöst; von dieser Lösung wurden 200 ccm abgemessen und auf 1 Liter ergänzt. Von dieser Lösung wurden je sechsmal die folgenden Mengen mit möglichst geeigneter Bürette in Präparatengläser abgemessen:

0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 ccm.

Sämtliche Meßgeräte waren mit Chromsäure-Schwefelsäure sorgfältig gereinigt und mit Wasser ausgewogen worden. Das Volumen wurde durch Zusatz von Wasser auf 12 ccm ergänzt, und zu jedem Präparatenglas wurden schließlich 2 ccm einer 0,005 n Kaliumferricyanidlösung, die gleichzeitig 0,1 Mol. Natriumcarbonat im Liter enthält, zugesetzt. Nach Mischung wurde im Wasserbade 15 Minuten erhitzt und nach Abkühlung und Zusatz von Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung mit Natriumthiosulfat, dessen Titer gegen $n/200 \text{ KJO}_3$ sowie $n/200 \text{ J}$ eingestellt war, titriert. Titrierung der 2 ccm Ferricyanidlösung ohne vorherige Erhitzung ergab:

2,00, 1,99, 1,99, 2,00, 2,00, 2,00, Durchschnitt 1,997.

Sämtliche Resultate sind in folgender Tabelle niedergelegt:

Tabelle IV.

Milligramm Glucose abgemessen	Milligramm Glucose korrigiert	0,005 n Kaliumferricyanid ccm						Durchschnitt
Blindwert 0,000	0,004	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,023
0,020	0,024	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,140
0,040	0,044	0,25	0,26	0,25	0,26	0,25	0,25	0,253
0,080	0,084	0,48	0,48	0,47	0,47	0,46	0,48	0,473
0,120	0,124	0,70	0,69	0,70	0,70	0,70	0,71	0,700
0,160	0,164	0,92	0,94	0,92	0,92	0,94	0,94	0,930
0,200	0,204	1,15	1,16	1,14	1,14	1,16	1,14	1,148
0,240	0,244	1,36	1,36	1,36	1,35	1,36	1,36	1,358
0,280	0,284	1,57	1,57	1,57	1,58	1,57	1,57	1,572
0,320	0,324	1,77	1,76	1,77	1,76	1,77	1,77	1,767
0,360	0,364	1,94	1,93	1,92	1,92	1,93	1,94	1,930

Die Korrektur des Glucosewertes geschieht, nach den oben angegebenen Prinzipien, durch folgende Berechnung (x = Blindwert als Glucose berechnet)

$$\frac{x}{0,020 + x} = \frac{0,023}{0,140}; x = 0,004 \text{ mg Glucose.}$$

Für die weitere Bearbeitung des Zahlenmaterials wurde folgende Formel rechnerisch ermittelt (G , Glucose in Milligrammen; K , Kaliumferricyanid in Kubikzentimetern 0,005 n).

$$G = 0,1735 \cdot K + \frac{0,0050 K}{2,27 \div K}.$$

Die Verwendbarkeit der Formel geht aus folgender Zusammenstellung hervor:

Tabelle V.

Verbraucht ccm 0,005 n Kaliumferricyanid	Glucose		Differenz
	abgemessen dmg	gefunden dmg	
0,140	0,240	0,246	+ 0,006
0,253	0,440	0,445	+ 0,005
0,473	0,840	0,833	- 0,007
0,700	1,240	1,237	- 0,003
0,930	1,640	1,648	+ 0,008
1,148	2,040	2,043	+ 0,003
1,358	2,440	2,431	- 0,009
1,572	2,840	2,839	- 0,001
1,767	3,240	3,243	+ 0,003
1,930	3,640	3,632	- 0,008
2,000	—	3,840	—

Mit Hilfe der Formel ist eine Tabelle, welche aus praktischen Gründen das Thiosulfat als Eingang benutzt, berechnet und am Schluß dieser Abhandlung angebracht.

Weder die Kaliumferricyanidlösung noch die Natriumthiosulfatlösung ist unter allen Umständen haltbar; es empfiehlt sich daher, eine 0,005 n Kaliumjodatlösung, die unbedingt haltbar ist, vorrätig zu haben und durch diese den Titer der Natriumthiosulfatlösung zu ermitteln. Ein kleiner Fehler im Titer der Ferricyanidlösung wird in den Blindwert aufgenommen und dadurch eliminiert. Um dieses sicherzustellen, sind einige Bestimmungen von bekannten Glucosemengen mit einer 5 % zu schwachen Kaliumferricyanidlösung vorgenommen; hierbei hat man keine Fehler gefunden, wenn die Glucosemenge 0,3 mg nicht übersteigt.

Um die Ferricyanidmethode bei der Bestimmung des Blutzuckers zu benutzen, müssen die Proteinstoffe des Blutes entfernt werden. Keine der besten bekannten Methoden hat sich für unseren Zweck vollständig bewährt; so ist in einigen von unseren Versuchen mit kolloidalem Eisen eine Spur von Eisenverbindungen ins Filtrat geraten. Deshalb haben wir die Fällung der Proteinstoffe mittels frisch gefälltem Zinkhydroxyd und kurzer Erhitzung vorgenommen.

Die Fällung gestaltet sich folgendermaßen: In ein Präparatenglas (15 × 150 mm) wird 1 ccm n/10 NaOH abpipettiert und 5 ccm einer 0,45proz. Zinksulfatlösung zugesetzt, wonach ein gelatinöser Niederschlag aus Zinkhydroxyd entsteht. Der Überschuß des Zinksulfats ist so bemessen, daß die Lösung nie alkalisch wird, selbst wenn die Abpipettierung der Lösungen recht ungenau ausgeführt wird.

Nun wird 0,1 ccm Blut mittels Kapillarpipette abgemessen, in die Zinkhydroxydaufschlammung ausgeblasen und die Pipette zweimal mit der Mischung ausgespült und leergeblasen, wonach das Präparatenglas in siedendem Wasserbade 3 Minuten erhitzt wird. Hierdurch bildet sich ein kristallklares Fluidum, in welchem der Proteinstoff als grobe, graue Koageln herumschwimmt.

Die Mischung wird in einen Glastrichter von 3 bis 4 cm Durchmesser, der mit einem kleinen Filter aus ausgewaschener, mit Wasser naß gemachter, nicht fest angedrückter Baumwolle beschickt ist, eingegossen, während der Trichter in einem Präparatenglas (30 × 90 mm) verweilt. Der Trichter und Filter wird zweimal mit je 3 ccm Wasser ausgewaschen. Nach Zusatz von 2 ccm alkalischer Kaliumferricyanidlösung wird das Glas 15 Minuten in siedendem Wasserbade erhitzt.

Daß die Proteinstoffe in der beschriebenen Weise vollständig entfernt worden waren, geht daraus hervor, daß *Jolles* Probe im Filtrat negativ ausfiel; auch die nach *J. Bangs* Mikromethode im Filtrat ausgeführte N-Bestimmung ergab einen dem normalen „Rest-N“ entsprechenden Wert.

Ferner wurde folgender Kontrollversuch ausgeführt: Von einer Glucoselösung wurde sechsmal 0,1 ccm abgemessen; in drei Proben wurde die Glucose direkt nach der Ferricyanidmethode bestimmt, gefunden:

0,273, 0,274, 0,274 mg. Mittel 0,274 mg. In den anderen drei Proben wurde die Glucose nach Zusatz von Zinkhydroxyd, Erhitzen im Wasserbade, Filtrieren und Auswaschen bestimmt, gefunden: 0,273, 0,274 und 0,275 mg Glucose. Mittel 0,274 mg.

Weiter wurde der Glucosegehalt in einer Probe von Oxalatblut durch 12 Analysen ermittelt. Hiernach sind 20 mg Glucose in einem 25 ccm-Meßkolben abgewogen und mit demselben Blute auf 25 ccm eingestellt worden. Nach Auflösung und guter Mischung wurden wieder 12 Analysen ausgeführt.

	Glucose					
	‰	‰	‰	‰	‰	
Für jede Bestimmung 0.1 ccm Blut	0,065	0,063	0,065	0,062	0,063	0,065
	0,065	0,065	0,063	0,062	0,065	0,062
	0,145	0,143	0,145	0,143	0,143	0,143
	0,143	0,143	0,145	0,143	0,141	0,141
Differenz: 0,079. Sollwert: 0,080.						
						Mittel: 0,064
						Mittel: 0,143

Die Präzision der Methode geht ferner aus folgender Analysenreihe hervor:

Für jede Bestimmung 0,1 ccm Blut	0,060	0,060	0,060	0,058	„Prozent“ d. h. g in 100 ccm
	0,063	0,060	0,061	0,058	
	0,061	0,061	0,060	0,061	

Die Präzision der Methode ist also eine ganz bedeutende.

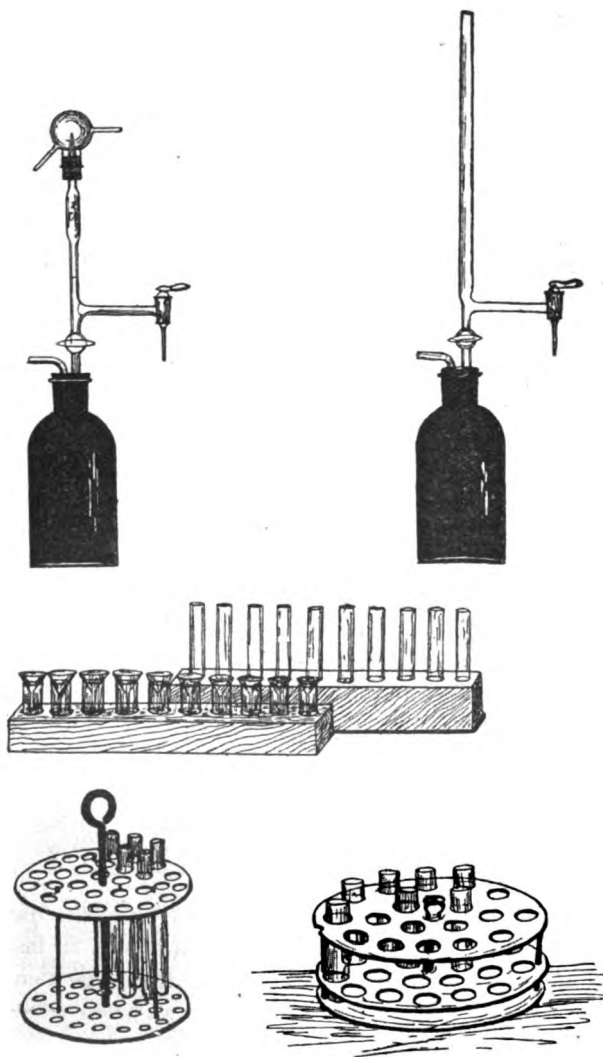
Die Ausführung der Methode erfordert keine besondere Übung. Mit der von uns angegebenen Apparatur lassen sich in einer Stunde 18 Analysen bequem ausführen und berechnen. Aus praktischen Gründen ist es wünschenswert zu wissen, inwiefern ein Stehenlassen der Blutprobe, ehe die Analyse vorgenommen wird, erlaubt ist. Einige Proben sind deshalb teils unmittelbar nach der Probeentnahme, teils später analysiert worden. Das Aufbewahren geschah bei Zimmertemperatur nach dem Filtrieren und Auswaschen. Es wurde gefunden:

	Glucose			Mittel
	‰	‰	‰	
Sofort analysiert	0,084	0,086	0,082	0,084
Nach 50 Stunden analysiert . . .	0,081	0,082	0,084	0,082
„ 100 „	0,084	0,082	—	0,083

Weiter ist untersucht worden, inwieweit es angeht, das Gemisch von Blut und Zinkhydroxyd vor dem Erhitzen stehen zu lassen, wobei eventuell eine Glykolyse eintreten könnte. Die folgenden Versuche zeigen, daß ein Stehenlassen der Proben bis zu einigen Stunden zulässig ist:

Tabelle VI.

Oxalatblut, Mensch		Glucose				Mittel
		‰	‰	‰	‰	
Koaguliert sofort		0,115	0,115	0,119	0,119	0,117
„ nach ½ Stunde		0,117	0,115	0,115	0,113	0,115
„ „ 3 „		0,115	0,117	0,115	0,117	0,116
„ „ 6 „		0,115	0,117	0,113	0,115	0,115



Die Einrichtung der Apparatur ist aus der Illustration ohne weiteres verständlich. Die automatische 2 ccm-Pipette wird für die alkalische Ferricyanidlösung, die 2 ccm-Bürette, die in 0,02 ccm eingeteilt ist, für die Thiosulfatlösung verwendet. Beim Auswaschen der Fällungsgläser und Filtertrichter benutzt man zweckmäßig große, in 3 ccm eingeteilte Pipetten. Das Spülwasser läßt man an der Wand des Präparatenglases unter Rotieren desselben einfließen.

Beispiel der Berechnung einer Analysenreihe:

Probe Nr.	A Verbraucht ccm Natrium- thiosulfatlösung	B $= A \cdot \frac{2,00}{1,90}$	C Der Tabelle entnommen	C ÷ Blindwert
1	1,26	1,33	0,119	0,111
2	1,32	1,39	0,108	0,100
3	1,00	1,05	0,168	0,160
4	1,16	1,22	0,138	0,130
Blinder Versuch . . .	1,86	1,95	0,008	—
„ „ „ „ „	1,85	—	—	—
2 ccm 0,005 n Jodat .	1,90	—	—	—
2 „ 0,005 n „ .	1,90	—	—	—

Erforderliche Lösungen:

Zur Proteinfällung: NaOH n/10

0,45 % Zinksulfat.

Wenn diese Lösungen eine Zeitlang gestanden haben, wird der Blindwert nach und nach größer. Es empfiehlt sich daher, sie etwa alle 8 Tage aus Stammlösungen frisch herzustellen. Als Stammlösungen kann man passend 2 n NaOH und eine Zinksulfatlösung, die in 100 ccm Lösung 45 g Zinksulfat enthält, vorrätig halten.

Zur Zuckerbestimmung:

1. Eine wässrige Lösung, die in 1 Liter 1,65 g Kaliumferricyanid und 10,6 g ausgeglühtes Natriumcarbonat enthält. Gegen Licht zu schützen.

2. Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung:

Kaliumjodid	5 g
Zinksulfat	10 g
Natriumchlorid	50 g
Wasser bis	200 ccm

Die Lösung ist nicht absolut haltbar, weil das Kaliumjodid gespalten wird. Deshalb empfiehlt es sich, die Lösung ohne Kaliumjodid in großer Menge vorrätig zu haben und nach und nach kleine Portionen mit Kaliumjodid zu bereiten. Ist freies Jod in der Lösung vorhanden, kann dieses mittels Filtrieren durch dickes Filtrierpapier fast vollständig beseitigt werden. Kleinere Fehler werden durch den Blindversuch eliminiert.

3. Essigsäurelösung:

Eisessig 3 ccm
Wasser bis 100 „

Der Eisessig muß eisenfrei sein. Eisessig „Kahlbaum“ hat sich bewährt.

4. Stärkelösung:

1 g lösliche Stärke wird in 100 ccm wässriger, gesättigter Natriumchloridlösung gelöst.

5. Natriumthiosulfatlösung:

0,7 g Natriumthiosulfat werden in 500 ccm Wasser gelöst.

Die Herstellung der Lösungen erfordert keine besondere Sorgfalt. Nur die zur Titerstellung zu benutzende Kaliumjodatlösung muß absolut richtig sein. Sie wird in der Weise hergestellt, daß 0,3566 g wasserfreies Kaliumjodat in Wasser bis 2 Liter gelöst wird.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Mikrozuckerbestimmung mittels Kaliumferricyanid angegeben.

ccm n/200 Natriumthiosulfat — mg Glucose										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene.

Von

E. Sarin.

(Aus dem Laboratorium für Chemie der Nahrungs- und Genußmittel der Universität Riga.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1922.)

Im Jahre 1873 stellten *Fischer* und *Siebold* bei der Honigbiene ferment-ausscheidende Speicheldrüsen fest.

Ein Jahr später bewiesen *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾, daß sich sowohl im Organismus der Biene, als auch im Bienenbrot und im Pollen Stoffe befinden, die fermentative Eigenschaften haben. Die genannten Forscher zergliederten 152 Arbeitsbienen in Kopf, Brust und Hinterleib und stellten aus jedem dieser drei Teile einen Glycerinauszug her. Es erwies sich, daß alle drei Auszüge Stärke in Dextrine und Zucker, Saccharose dagegen in Invertzucker verwandelten; dabei zeigten die Auszüge, die aus Kopf und Hinterleib der Bienen bereitet waren, eine weit größere Aktivität als der dritte, aus der Brust bereitete Auszug. Außerdem enthielten die beiden erstgenannten Auszüge noch ein Ferment, das Blutfibrin löste, während der dritte auf Fibrin keine Wirkung ausübte. Die Methodik, deren sich *Erlenmeyer* und *Planta* bei der Bereitung ihrer Auszüge bedienten, ist gänzlich ungeeignet, da der äußeren Zergliederung des Bienenkörpers in Kopf, Brust und Hinterleib keineswegs die Teilung des Darmkanals in charakteristische Abschnitte entspricht. Die Sektion einer Biene ergibt, daß der Vorderdarm den Kopf und die Brust durchzieht und in den Hinterleib mündet, wo er sich mit dem Mitteldarm vereinigt; auch der hintere Darm liegt im Hinterleib. Wegen dieser Lage der Teile des Darmkanals wird beim Abtrennen von Kopf und Brust der Mitteldarm zerstückelt, wobei sein hinteres Ende und alle übrigen Teile des Darmkanals im Hinterleib zurückbleiben. Es ist klar, daß es bei dieser Lage der Dinge unmöglich ist, einigermaßen entscheidende Resultate zu erhalten. Die Hoffnungslosigkeit einer derartigen Methodik wird noch dadurch erhöht, daß sich im Kopfe und in der Brust ein verwickeltes System von Speicheldrüsen befindet. Bei der Untersuchung von Auszügen aus Teilen des Bienenkörpers kann man unmöglich feststellen, welchem seiner Bestandteile diese oder jene Wirkung zuzuschreiben ist, dem Darm, den Speicheldrüsen oder irgend einem anderen Körpergewebe, wie z. B. der Hämolymphe, dem Nervengewebe oder anderen. *Erlenmeyer* und *Planta* bereiteten auch einen Glycerinauszug aus Bienenbrot und zeigten, daß es gleichartige, jedoch stärkere, fermentative Eigenschaften besitzt als die früher erwähnten Auszüge. Auch der frische Pollen verwandelte Stärke in Dextrine und Zucker und Saccharose in Invertzucker.

*Azenfeld*²⁾ wandte eine richtige Methodik an, indem er den Darmkanal der Bienen in drei Teile zergliederte; diese Teile fügte er zu einer

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, Chem. Zentralbl. 1874, S. 790.

²⁾ *Azenfeld*, Zentralbl. f. Physiol. 17, 268, 1903.

Saccharoselösung, wobei es sich erwies, daß die stärkste Wirkung der Vorderdarm ausübte, die schwächste aber der hinterste Teil des Darmes; auch der Honigmagen war sehr wenig aktiv. Daher nimmt *Axenfeld* an, daß nur der Vorderdarm das Ferment enthält. *Petersen*¹⁾ befaßte sich während seiner Studien über die Verdauung der Honigbiene auch mit der Bestimmung von Fermenten in ihren Verdauungsorganen. Im Glycerinauszug des Bienenmagens konnte er folgende Fermente nachweisen: Diastase, Invertase und ein peptolytisches Ferment, das Fibrin löste und Pepton spaltete.

Eigene Untersuchungen.

Die Lebensbedingungen der Biene im Winter unterscheiden sich scharf von denen des Sommers, sowohl in Hinsicht auf die Nahrungsaufnahme, als auch auf die Defäkation. Man kann von vornherein annehmen, daß der Stoffwechsel der Biene in den verschiedenen Jahreszeiten verschiedenartig ist. Ihr geschlechtlicher Dimorphismus, der auf die Arbeitsteilung des Bienenstaates und die Verschiedenheiten der physiologischen Funktionen ihrer Glieder tief einwirkt, kann auch in der Arbeit ihrer Verdauungsorgane zum Ausdruck kommen. Dieser Umstände eingedenk, haben wir im ganzen 795 lebende Bienen, sowohl Arbeiterinnen als auch Drohnen, in verschiedenen Jahreszeiten eingesammelt und der Untersuchung unterworfen. Um die nötige Menge Auszug aus dem Darmkanal zu erhalten, muß man jedesmal mehrere Bienen öffnen. Diese Arbeit wurde (wie das auch bei der vorigen Arbeit geschehen war) von *E. N. Pawlowski* getan, der seinerseits auch die anatomisch-histologische Untersuchung der Verdauungsorgane der Biene ausführte²⁾. Die durch Chloroform oder Äther getöteten Bienen wurden geöffnet und ihr Darmkanal mit Hilfe des Skalpells in folgende Abschnitte zerlegt: a) Honigmagen (Vorderdarm), b) Magen (Mitteldarm), c) Dünndarm (vordere Hälfte vom hinteren Teil des Darmes) und d) Rektum oder Dickdarm (hinteres Ende vom hinteren Teil des Darmes). Jeder einzelne Darmabschnitt wurde von seinem Inhalt befreit und sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, dann in ein entsprechendes Schälchen gebracht, auf dessen Boden sich ein wenig ausgeglühter Seesand befand. Außerdem kamen in jedes Schälchen zwei bis drei Tropfen Glycerin oder einer anderen Flüssigkeit, die man zum Bereiten des Auszugs benutzen wollte. Als nächstes wurde der Inhalt jedes Schälchens mit einem Pistill zerrieben, bis eine gleichförmige Masse entstanden war, worauf in jedes die notwendige Menge Glycerin oder einer andern Flüssigkeit gegeben, alles gut umgerührt und in ein Glas mit eingeschlifffenem Stopfen gegossen wurde. Auf diese Weise wurden

¹⁾ *Petersen*, Pflügers Arch. 145, 121, 1912.

²⁾ *Pawlowski* and *Sarin*, Quarterly Journ. of Microscop. Science 66, Part III, 1922.

sämtliche Auszüge aus den Teilen des Darmes bereitet. Es muß bemerkt werden, daß die Einmündungen der *Malpighischen* Gefäße, wie auch diese Gefäße selbst, bei der Präparierung entfernt wurden und nicht in die Auszüge gerieten; höchstens zufällig konnten vielleicht einige Röhrchen an der Oberfläche des Darmes nachgeblieben sein. Die bei der Bereitung der Auszüge benutzten Flüssigkeiten waren: a) Glycerin, b) destilliertes Wasser, c) ein Gemisch aus gleichen Teilen der beiden eben genannten Flüssigkeiten, und d) physiologische (0,75 %) Kochsalzlösung. Als Antiseptikum kamen noch einige (5 bis 10) Tropfen Toluol hinzu. Die Gläser wurden einige Male stark umgeschüttelt und blieben dann bei Zimmertemperatur und Lichtabschluß bestimmte Zeiten stehen.

Tabelle I.

Die Zubereitungsarten der Auszüge aus dem Darmkanal der Bienen, die zu den Versuchen benutzt wurden.

Numer des Versuchs	Zeit der Herstellung	Zahl der Bienen, aus denen der Darmkanal herauspräpariert wurde	Flüssigkeits- volumen	Art der Flüssigkeit	Menge v. Toluol in Tropfen
1	23. X. 1916	90 Arbeiterinnen	30	Glycerin	10
2	7. IV. 1917	60 "	25	"	10
3	22. VI.	60 "	25	Wasser	10
4	22. VI.	30 "	12,5	Glycerin	5
5	20. VII.	50 Drohnen	25	"	10
6	21. IX.	40 Arbeiterinnen	20	"	8
7	15. XI.	30 "	30	15 ccm Glyc. + 15 ccm Wasser	10
8	31. III. 1918	30 "	30	15 " " + 15 " "	10
9	31. III.	30 "	30	Wasser	10
10	14. IV.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
11	15. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
12	21. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
13	23. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
14	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
15	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
16	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
17	2. VII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
18	3. VII.	15 Drohnen	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
19	3. VII.	25 Arbeiterinnen	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
20	6. VIII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
21	6. VIII.	15 "	15	Wasser	5
22	6. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
23	6. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
24	20. VIII.	25 "	50	25 ccm Glyc. + 25 ccm Wasser	10
25	20. VIII.	15 "	15	Wasser	5
26	20. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
27	20. VIII.	15 "	15	Physiolog. Kochsalzlösung	5
28	20. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
29	24. X.	25 "	50	25 " " + 25 " "	10
30	24. X.	25 "	50	Wasser	10

Im ganzen: 795 Bienen

Tabelle II.

Katalase im Darmkanal der Biene.

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Konzentration und Zusammensetzung des Auszugs	Sauerstoff in ccm			
			Honigmagen	Magen	Dünndarm	Dickdarm
1	8. IV. 1917	60 Bienenmagen in 25 ccm Glyc.	0	6,5	0	2,0
2	23. VI.	30 " " 12,5 " "	0	1,5	0	0
3	16. XI.	30 " " 15 " " + 15 ccm Wasser	0	1,3	0	0
4	1. IV. 1918	30 " " 15 " " + 15 " "	0	11,5	0	3,5
5	1. IV.	30 " " 30 " Wasser	0	9,5	0	2,0
6	15. IV.	15 " " 7,5 " Glyc. + 7,5 " "	0	7,3	0	3,3
7	15. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	13,2	0	2,8
8 ¹⁾	22. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	5,3	0	0,3
9	24. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	7,0	0	0
10	19. VI.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	9,2	0	0
11	2. VII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	3,0	0	0
12	4. VII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	2,0	0	0
13	4. VII.	15 Drohnenmagen, 7,5 " " + 7,5 " "	0	2,5	0	0
14	7. VIII.	25 Bienenmagen " 25 " " + 25 " "	0	8,5	0	0
15	21. VIII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	4,0	0	0

Durch eine diesbezügliche Untersuchung könnte vielleicht aufgeklärt werden, warum es nicht möglich ist, südliche Bienen im Norden zu akklimatisieren. Wenn sie in den Norden übergeführt werden, so kommen sie in die ihnen ungewohnten Bedingungen der langen Winterruhe, und folglich häufen sich in ihrem Dickdarm große Kotmengen an. Es ist verständlich, daß ihr Organismus, der an solche Bedingungen nicht angepaßt ist, verschiedenen Erkrankungen ausgesetzt ist, unter denen verheerende Durchfälle wohl den ersten Platz einnehmen.

Um festzustellen, ob die Sekrete der verschiedenen Teile des Darmkanals bei einer gegenseitigen Mischung einander nicht stimulieren, bestimmten wir die Menge Katalase bei allen möglichen Kombinationen der Auszüge; in jedem einzelnen Falle wurden je 2 ccm der unten erwähnten Auszüge benutzt:

	Frühling 1. IV. 1918 ccm	Sommer 4. VII. 1918 ccm
A Honigmagen + Dünndarm + Dickdarm . . .	4,0	0
B " + "	0,0	0
C " + Dickdarm	4,0	0
D Dünndarm + "	3,9	0

Diese Versuche zeigen, daß im Frühling Katalase, außer vom Magen, nur noch vom Dickdarm ausgeschieden wird (Versuche A, C, D). Die übrigen zwei Abschnitte des Darmkanals (Honigmagen und Dünndarm)

¹⁾ Für den Versuch Nr. 8 sind solche Bienen genommen worden, die bereits ihren ersten Frühjahrsausflug gemacht hatten, wobei der Inhalt des Dickdarms entleert worden war.

scheiden weder einzeln, noch im Gemisch mit anderen (B) Katalase aus; im Sommer hingegen, bei normaler Nahrungsaufnahme der Bienen, wird das Ferment nur durch den Magen erzeugt. Um den Einfluß der Auszugsdauer der Extrakte auf die Aktivität der Katalase zu studieren, wurden besondere Versuche unternommen. In einer Portion wurden die einzelnen Teile des Darmkanals mit frisch ausgeglühtem Seesand unter Zugabe einiger Tropfen Glycerin sorgfältig verrieben; die erhaltene Emulsion wurde mit einem Gemisch gleicher Teile Wasser und Glycerin verdünnt und zehn Tropfen Toluol hinzugefügt. Zur Bereitung der zweiten Portion wurden dieselben Teile des Darmkanals benutzt, nur wurden die Stückchen nicht verrieben, sondern so, wie sie waren, in ein Glycerin-Wassergemisch getaucht.

In der Tabelle III sind die Zeitabschnitte der Katalaseeinwirkung, sowie die Resultate der Bestimmung angegeben.

Tabelle III.

Einfluß der Dauer der Extraktion aus dem Darmkanal auf die Aktivität der Katalase im Zusammenhang mit der Herstellungsweise des Auszugs.

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Konzentration und Zusammensetzung des Auszugs	Der Teil des Darmkanals	Die Dauer der Extraktion aus den Teilen des Darmkanals in verriebenen sowie unverriebenen Zustände									
				$\frac{1}{2}$ Stunde	24 Stunden	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	7 Tage	12 Tage	14 Tage	30 Tage
				Sauerstoff in ccm									
16	18. VI. 1918	15 Bienen- därme in 30 ccm Gly- cerin + 30 ccm Wasser	Verriebene	Honig- magen	0	0	—	0	—	—	—	—	—
16 a			Unverriebene	Magen	0	0	—	0	—	—	—	—	—
17			Verriebene	Magen	9,2	9,2	—	6,0	—	—	3,0	—	1,0
17 a			Unverriebene	Magen	3,7	16,7	—	22,0	—	—	21,0	—	5,0
18			Verriebene	Dünn- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
18 a			Unverriebene	Dünn- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
19	4.VII. 2.VII. 1918	25 Bienen- därme in 50 ccm Glycerin + 50 ccm Wasser	Verriebene	Dick- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
19 a			Unverriebene	Dick- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
20			Verriebene	Magen	4,5	3,8	3,0	2,4	2,5	2,5	—	—	2,2
20 a			Unverriebene	Magen	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	—	—	0,2
21			Verriebene	Magen	2,0	1,8	2,0	1,2	—	—	—	1,2	—
21 a			Unverriebene	Magen	1,0	1,3	2,2	2,0	—	—	—	0,5	—

Aus den Daten der Tabelle läßt sich folgendes ersehen:

Katalase wird, wie gewöhnlich, nur vom Bienenmagen produziert. Die Menge des Ferments ist äußerst verschieden, je nachdem der Auszug aus verriebenen oder nicht verriebenen Teilen hergestellt ist. Im ersten Auszuge (Nr. 17) ließ sich nach halbstündigem Stehen fast die dreifache Menge nachweisen als im zweiten (Nr. 17 a).

Die Aktivität des Ferments in den nächstfolgenden Tagen war in beiden Fällen sehr verschieden. Im Auszuge aus den verriebenen Magen fiel die Aktivität beständig bis zum völligen Verschwinden, das nach 30 Tagen festgestellt werden konnte. Bei dem Parallelversuch mit nicht

verriebenen Magen dagegen nahm die Aktivität der Katalase mit der Auszugsdauer schnell zu. So war die Wirkung des Ferments schon nach 24 Stunden viermal stärker geworden, als sie am Anfang war, am 3. Tage fast um das Sechsfache, erst vom 7. Tage an fing die Aktivität an, äußerst schnell zu sinken.

Diese Verschiedenheit in der Aktivität erkläre ich durch die verschiedene Bereitungsweise der Auszüge. Beim sorgfältigen Verreiben des Magens werden seine Gewebezellen zerstört und es wird die maximale Katalasemenge frei, die mit der Dauer des Stehens inaktiv zu werden anfängt. Wenn dagegen die Stückchen des Magens nicht verrieben werden und folglich nur eine kleine Anzahl seiner Zellen zerstört wird, so kann nur eine kleine Fermentmenge in Lösung gehen, deren Aktivität zunimmt.

Das kann auf zweierlei Art erklärt werden: entweder fahren die unzerstörten Zellen des Magens fort, Katalase zu entwickeln, oder ihre Menge bleibt dieselbe und geht während des Stehens allmählich aus dem Gewebe in die Flüssigkeit über.

Die beiden nächsten Parallelversuche (Nr. 20, 20a und Nr. 21, 21a), die zur Bestätigung des eben Angeführten unternommen wurden, ergaben ein etwas anderes Bild. Bei den aus verriebenen Magen hergestellten Auszügen konnte die Tatsache der sofortigen Ausscheidung größerer Katalasemengen bestätigt werden, ebenso auch die allmähliche Abnahme der Aktivität. Doch konnte eine Zunahme der Fermentwirkung bei den Auszügen aus nicht verriebenen Magen nur in Nr. 21a nachgewiesen werden, wo am 2. Tage die Aktivität doppelt so groß geworden war. Dagegen konnte bei Versuch Nr. 20a keine Zunahme der Wirkung gefunden werden: 5 Tage stand die Aktivität auf derselben Höhe.

Die angeführten Versuche zeigen, daß die Wirkung der Katalase sehr mannigfaltig ist, was von einer ganzen Reihe von Bedingungen abhängt, unter denen die Individualität des Stoffwechsels der Biene wohl den ersten Platz einnimmt. Die Aufklärung dieser Bedingungen muß einer besonderen Arbeit vorbehalten bleiben.

Amylase.

Die Gegenwart von Amylase im Bienenorganismus wurde von *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾ und von *Petersen*²⁾ nachgewiesen.

Bei unseren Versuchen benutzten wir Auszüge, deren Bereitung auf S. 61 beschrieben wurde.

Zu 2 ccm dieser Auszüge kamen 0,1 ccm einer 0,5proz. Lösung löslicher Stärke, 8 ccm Wasser und zwei Tropfen Toluol, dann wurden die Probierröhrchen auf eine Stunde in ein Wasserbad von 45° C gestellt. Nach dieser Zeit wurden sie herausgenommen, abgekühlt und tropfenweise mit einer Jod-Jodkalilösung versetzt.

Alle Auszüge aus den Bienenmagen ergaben ein positives Resultat: nach dem Hinzufügen von Jodlösung färbten sich alle hellgelb; die Auszüge aus den drei anderen Teilen des Darmkanals, nämlich aus dem Honigmagen, Dünn- und Dickdarm enthielten dagegen keine Amylase: das Gemisch wurde beim Versetzen mit Jod blau.

Unsere Versuche ergeben also, daß Amylase nur im Magen der Biene zu finden ist, während die anderen Teile des Darmkanals dieses Ferment

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, l. c.

²⁾ *Petersen*, l. c.

wird vermischt. Daher geht die Spaltung der Nahrung nicht nur bei der Verdauung, sondern auch bei der Assimilation einher. Die Bildung von Maltose und Lactose durch den Amylasegehalt des Magens kann daher die Biene auch während der Nahrungsaufnahme ausführen.

Daß *Pterodon* und *Panurginus* in allen ihren Aussägen (aus Kopf, Brust und Hinterleib) gebundene Enzyme, kann im Zusammenhang mit unseren Beobachtungen in Betracht gezogen werden. Die im Hinterleib nachgewiesene Amylase stammt nicht aus dem Magen der Biene, in Aussägen aus Kopf und Brust dagegen wird sie durch die Speicheldrüsen erzeugt, da der die beiden genannten Teile durchsetzende Fortdarm keine Speiseröhre, keine Speiseröhre enthält.

Inulinase.

Die bei der Verdauung von Inulin im Bienenorganismus finden sich in der Literatur keine Angaben.

Von unseren Versuchen berichten wir über eine 1proz. Inulinlösung mit 2 ccm des zu prüfenden Extrakts. Nachdem sich das Gemisch 64 und 72 Stunden im Trockenschrank bei 36 bis 40° C befunden hatte, kam es zu keinem einzigen Fall einer Reduktion von Fehlingscher Lösung hervor.

Man kann daher annehmen, daß vom Darmkanal der Biene Inulinase nicht erzeugt wird.

Lactase.

In der Literatur liegen keine Mitteilungen darüber vor, ob der Darmkanal der Biene Lactase ausscheidet. Zur Bestimmung dieses Ferments legten wir zu je 50 ccm einer 5proz. Milchzuckerlösung je 5 ccm von unseren Versuchen. Das Gemisch wurde 48 Stunden auf 37 bis 40° C gehalten, und 20° C abgekühlt, ein Tropfen Ammoniak zugesetzt (um Multirotation zu verhindern) und die Drehung der Polarisationssebene ermittelt. Bei keinem einzigen Versuch konnte eine Differenz der Drehungswinkel zwischen dem Versuchs- und Kontrolllösungen beobachtet werden.

Aus diesen Versuchen ist daher der Schluß zu ziehen, daß vom Darmkanal der Biene keine Lactase erzeugt wird.

Invertase.

Invertase wurde ebenfalls nur im Magen der Biene nachgewiesen. Näheres über dieses Ferment werde ich in einer anderen Arbeit mitteilen.

Lipase.

Als Fettaufnahme kommt für die Biene hauptsächlich das Bienenbrot in Betracht, das nach unseren Untersuchungen bis 6% Fettstoffe enthält. Die Frage, ob die Fettstoffe des Bienenbrots vom Bienenorganismus assimiliert werden, konnte bis jetzt nicht als gelöst angesehen werden, da in der Literatur keinerlei Angaben über das Vorkommen von Lipase im Bienenkörper vorliegen. (Petersen¹⁾), dem es nicht gelang, in den Epithelzellen des Verdauungstraktes der Biene durch Osmiumsäure und den Farbstoff Sudan III Fette nachzuweisen, sagt: „Als sicher darf ich wohl hinstellen, daß das meiste Fett, auch der normalen Nahrung, den Darm passiert, ohne gespalten oder resorbiert zu werden.“

¹⁾ Petersen, l. c.

Um Lipase festzustellen, benutzten wir 1proz. Lösung von Monobutyryn und Emulsionen aus Provenceröl. Zu 10 ccm der Monobutyryn-lösung oder der Emulsion wurden je 2 ccm der auf Lipase zu prüfenden Auszüge und drei Tropfen Toluol zugesetzt. Die Röhren mit den Flüssigkeiten kamen auf 48 Stunden in einen Thermostaten von 35 bis 38° C, worauf die Proben mit n/10 Natronlauge bei Gegenwart von Phenolphthalein als Indikator titriert wurden; die Ölemulsionen erhielten vor dem Titrieren noch 10 ccm eines vorher neutralisierten Gemisches aus Äther und Alkohol.

Alle ausgeführten Versuche ergaben im allgemeinen gleiche Resultate. Nur die Röhren, die Auszüge aus dem Magen enthielten, wiesen eine Zunahme der Azidität auf, sowohl bei der Monobutyrynlösung als auch bei der Emulsion; diese Zunahme schwankte bei unseren Versuchen zwischen 0,3 bis 0,6 ccm n/10 NaOH, wobei das Ferment auf Monobutyryn eine stärkere Wirkung ausübte als auf Olivenöl.

Auszüge aus anderen Teilen des Darmkanals hatten dagegen auf die Azidität der Probelösungen keinen merkbaren Einfluß.

Aus diesen Versuchen läßt sich daher der Schluß ziehen, daß der Bienen- und Drohnenmagen neben anderen Fermenten auch Lipase ausscheidet; die Biene kann also auch Fette assimilieren.

Pepsin.

Um dieses Ferment festzustellen, benutzten wir folgende Methoden:

1. Eine sterile 10proz. Gelatinelösung wurde mit Salzsäure angesäuert und in dünne Probierröhren verteilt (2 ccm in jedes). In jedes Röhren kamen 2 ccm der zu prüfenden Auszüge und drei Tropfen Toluol. Das Gemisch wurde in einen Thermostaten von 35 bis 38° C gestellt und alle 24 Stunden beobachtet, wie weit die Gelatine bei Abkühlung erstarrte.

2. Ein Stück Blutfibrin wurde in ein Gemisch aus 8 ccm sterilen Wassers (mit Salzsäure angesäuert), 2 ccm der auf Pepsin zu untersuchenden Auszüge und drei Tropfen Toluol getaucht und kam dann in einen Thermostaten von 35 bis 38° C.

3. Es wurde eine 1proz. Caseinlösung bereitet, die im Liter 16 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,124 enthielt. 10 ccm dieser Caseinlösung wurden mit 2 ccm der zu prüfenden Extrakte versetzt und auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38 bis 40° C gestellt. Nach dieser Zeit wurde tropfenweise eine konzentrierte Natriumacetatlösung hinzugefügt.

Diese drei Methoden gaben in allen Fällen übereinstimmende Resultate: Pepsin wurde nur im Bienen- und Drohnenmagen festgestellt; die übrigen Teile des Darmkanals enthielten es nicht.

1. Gelatine, die mit Extrakten aus Bienen-Drohnenmagen versetzt war, verlor die Fähigkeit zu erstarren nach 1 bis 3 Tagen, während Extrakte aus den übrigen Teilen des Darmkanals auch nach 20 Tagen keinen bemerkbaren Einfluß auf den Erstarrungsgrad der Gelatine ausübten¹⁾.

2. In den Röhren, in denen sich Auszüge aus dem Magen befanden, löste sich Fibrin innerhalb 1 bis 3 Tagen; in den übrigen Röhren wurde

¹⁾ Um festzustellen, ob das verflüssigte Gelatinegemisch und die Fibrinlösung steril geblieben waren, wurden Impfungen auf schräg erstarrtem Agar gemacht: nach 36stündigem Verweilen bei 37° C wurde keine Entwicklung von Bakterien beobachtet.

es auch nach 20 Tagen nicht verändert. Nach dieser Zeit wurde sowohl in 1. als auch in 2. der Versuch abgebrochen.

3. Auch die Caseinprobe gab eine positive Reaktion nur bei Extrakten aus dem Magen.

Aus dem oben Angeführten kann man daher schließen, daß der Bienen- und Drohnenmagen ein peptisches Ferment enthält, das in saurer Lösung seine Wirkung äußert, während der Honigmagen, der Dünndarm, sowie auch der Dickdarm mit den Rektaldrüsen kein derartiges Ferment ausscheiden.

Trypsin.

Um Trypsin festzustellen, wurden folgende zwei Lösungen benutzt:

1. Eine alkalische 10proz. Gelatinelösung, wie bei der Pepsinbestimmung; die Verflüssigung erfolgte nach 1 bis 3 Tagen, und zwar nur bei den Extrakten aus dem Magen.

2. Eine alkalische Caseinlösung: 10 ccm einer 1proz. Lösung von Casein, die auf 200 ccm zehn Tropfen einer 10proz. Sodalösung enthielt, wurden mit 2 ccm der zu prüfenden Auszüge versetzt; das Gemisch kam auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38 bis 40° C, worauf tropfenweise 0,5proz. Essigsäurelösung zugefügt wurde: falls das Casein unverändert geblieben war, entstand eine Trübung.

Die beiden beschriebenen Methoden ergaben in allen Fällen gleiche Resultate, wobei Trypsin nur im Magen der Biene und Drohne gefunden wurde, während andere Teile des Darmkanals dieses Ferment nicht enthielten.

Chymosin.

In der Literatur findet man nichts über das Vorkommen von Chymosin im Bienenorganismus.

Zur Bestimmung dieses Ferments wurde ein Gemisch aus 10 ccm Milch + 9 ccm Wasser + 1 ccm 10proz. Chlorkaliumlösung hergestellt. 10 ccm dieses Gemisches wurden mit 1 ccm der zu prüfenden Auszüge versetzt und darauf in ein Wasserbad von 40° C gestellt. Extrakte aus dem Magen koagulierte Milch, und zwar stets, wobei sich bei den von uns ausgeführten Versuchen das Koagulum nicht früher als nach 2, und nicht später als nach 15 Minuten bildete. Dagegen konnte bei Auszügen aus anderen Teilen des Darmkanals keine Koagulation bemerkt werden, selbst nicht nach dreistündigem Stehen; nach dieser Zeit wurde der Versuch abgebrochen.

Die Versuche zeigen also, daß sich im Magen der Biene und Drohne ein Labferment von bedeutender Aktivität befindet.

Emulsin.

Es wurden von Amygdalin, Salicin und Arbutin 1proz. Lösungen hergestellt.

25 ccm jeder Lösung wurden mit 5 ccm des entsprechenden Extrakts und fünf Tropfen Toluol versetzt und kamen dann in einen Thermostaten von 36 bis 40° C. Nach 24 bis 48 bis 72 Stunden konnte keine Glykosid-

spaltung beobachtet werden: die Flüssigkeiten reduzierten nicht *Fehlingsche* Lösung, und beim Amygdalin konnte auch nicht der charakteristische Blausäuregeruch wahrgenommen werden.

Es erweist sich, daß unter unseren Versuchsbedingungen im Darmkanal der Biene keine Fermente gefunden wurden, die Amygdalin, Salicin oder Arbutin spalteten.

Schlußbetrachtung.

Betrachten wir noch zum Schluß die Verteilung der oben angeführten Fermente auf die Abschnitte des Darmkanals der Biene (Tab. IV). Wenn man die verschiedenen Lebens- und Nahrungsbedingungen der Arbeitsbienen und Drohnen in Betracht zieht, so könnte man meinen, daß auch die von ihrem Darm erzeugten Fermente verschieden seien. Parallelversuche ergaben jedoch unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen keinerlei Unterschiede in den Fermentausscheidungen der Arbeitsbienen und Drohnen.

Sämtliche gefundenen Fermente wurden nur im Magen der Biene festgestellt. Die Tatsache, daß nur der Mitteldarm der Biene Fermente ausscheidet, ist völlig analog der Erscheinung, die man auch bei anderen Insekten beobachtet, da sich bei allen Arthropoden die hauptsächlichsten Verdauungsprozesse im Mitteldarm und im Hepatopankreas abspielen.

Tabelle IV.

Gesamttabelle der in verschiedenen Teilen des Darmkanals der Arbeitsbiene und der Drohne gefundenen Fermente.

	Honig- magen	Magen	Dünn- darm	Dick- darm	Bemerkungen
Katalase	—	+	—	○	○ Man findet sie im Dickdarme nur während der zweiten Hälfte des Winters.
Amylase	—	+	—	—	
Inulinase	—	—	—	—	
Lactase	—	—	—	—	
Invertase	—	+	—	—	
Lipase	—	+	—	—	
Pepsin	—	+	—	—	
Trypsin	—	+	—	—	
Chymosin	—	+	—	—	
Emulsin	—	—	—	—	

+ bedeutet beständige Anwesenheit des Ferments.

○ bedeutet beständige Anwesenheit des Ferments nur in bestimmten Zeiten.

— bedeutet Abwesenheit des Ferments.

Bei der Betrachtung der obenstehenden Tabelle IV fällt es auf, daß Katalase in den Extrakten aus dem Dickdarm nicht immer gefunden wird. Das scheint eine gewisse Dissonanz in die Resultate der Arbeit zu bringen und widerspricht allgemein anerkannten Tatsachen. Doch

beim näheren Hinsehen läßt sich eine bestimmte und überzeugende Erklärung dafür finden. Die Sache ist die, daß im Auszug aus dem rectum Katalase nicht zufällig gefunden wurde, sondern in einer bestimmten Jahreszeit, nämlich im Frühling, bevor die Bienenstöcke ins Freie gestellt wurden. In dieser Zeit findet sich im rectum sehr viel Katalase; nach den ersten Ausflügen der Bienen nimmt jedoch die Fermentmenge plötzlich ab, und schon nach 2 Tagen kann im Dickdarm der Biene keine Katalase mehr nachgewiesen werden. Dies ist naturgemäß mit der Arbeit des Darmkanals während des Winters verknüpft. Die Biene nimmt die ganze Zeit Nahrung zu sich, doch entleert sie sich nicht während ihrer Winterruhe. Die Folge davon ist, daß sich der Kot im rectum ansammelt und es bis zu außerordentlichen Dimensionen vergrößert. Der Magen wird kürzer und dicker, besonders schwillt aber der Dickdarm an, der sich in eine riesige, ovale Blase verwandelt, in der sich (wie auch im Dünndarm) eine unermessliche Menge Bakterien ansammelt. Es ist unzweifelhaft, daß sich die Kotansammlung und ihr langes Verweilen im rectum auf die eine oder andere Weise im Stoffwechsel der Biene spiegeln muß. Das äußert sich darin, daß der Dickdarm während der Zeit, wo die Biene sich nicht entleeren kann, Katalase ausscheidet. Die intensive Erzeugung dieses Ferments steht im Zusammenhang damit, daß der Organismus energischere Oxydationsprozesse benötigt, während im Sommer eine solche Notwendigkeit nicht vorliegt, da sich der Darmkanal dann seiner Exkremente normal entledigen kann.

Wir können also logisch erklären, warum Katalase im rectum vorkommt. Es bleibt noch übrig nachzuweisen, an welcher Stelle dieses Ferment gebildet wird. Es liegen zwei Möglichkeiten vor: a) entweder wird die Katalase durch die Wandungen des Dickdarms abgeschieden (lokaler Ursprung des Ferments) oder b) die Katalase entstammt den höher gelegenen Teilen des Darmkanals, nämlich dem Magen, von wo er mit der Nahrung ins rectum gelangt.

Betrachten wir zunächst die zweite Möglichkeit. Bei der Extraktbereitung aus dem rectum wurde der Dickdarm der Biene zerschnitten, wobei die Kotmassen von selbst herausfielen; darauf wurde die Wandung des Darmes mit frischer physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Nur dann, wenn das rectum auf diese Weise von seinem Inhalt gereinigt war, wurde es mit Sand und Glycerin zerrieben. Die beschriebene Vorsichtsmaßregel verbürgt in gewissem Grade die Reinheit des herzustellenden Auszugs und gibt uns folglich das Recht, der Dickdarmwandung selbst die Fähigkeit zuzuschreiben, Katalase zu erzeugen.

riekt wird diese Schlußfolgerung auch durch einen anderen Um-
rt. Wenn wir die Annahme machen, daß die Katalase
Nahrung aus dem Magen ins rectum gelangt, so

müßte dieses Ferment nicht nur während des ganzen Jahres im Dickdarm zu finden sein, sondern auch im Dünndarm, der den Magen mit dem rectum verbindet. Doch wurde nicht ein einziges Mal Katalase im Dünndarm festgestellt, trotzdem die entsprechenden Auszüge weniger sorgfältig hergestellt wurden. Dieser Teil des Darmkanals ist nämlich sehr dünn, daher konnten die in ihm befindlichen Kotmassen in der Regel nicht entfernt werden, und die Extrakte wurden aus Stücken des Dünndarms mit seinem gesamten Inhalt an Exkrementen und Bakterien hergestellt. Dieser Umstand spricht auch gegen die Annahme, daß die Katalase von den sich im Dickdarm ansammelnden Bakterien erzeugt wird: denn in diesem Falle müßte sich dieses Ferment im rectum nicht nur im Frühling, sondern auch während der Winterruhe nachweisen lassen. Wenn nun Auszüge aus dem höher gelegenen Teil des Darmkanals und seinem Inhalt keine Katalase aufweisen, dagegen der Extrakt aus den gesäuberten Wandungen des Dickdarms sie enthält, so muß man folgern, daß dieses Ferment vom Dickdarm der Biene erzeugt wird, nicht aber aus anderen Teilen des Darmkanals dort hingelangt. Während das rectum der Biene wenigstens periodisch Fermente (Katalase) ausscheidet, ist der Honigmagen dazu gänzlich unfähig. Denn in den Extrakten aus dem Honigmagen konnten nie irgendwelche Fermente festgestellt werden. Dieser Umstand gibt uns die Möglichkeit, der Lösung der Frage nach der Honigbildung näherzukommen.

Die Biene sammelt den Nektar in den Honigmagen, von wo sie ihn in die Waben ablegt. Ist nun der Honigmagen ein passives Reservoir zur zeitweiligen Aufbewahrung des Nektars, oder gehen in ihm außer der Spaltung des Rohrzuckers noch andere biochemische Prozesse vor sich? Was geschieht mit dem in die Waben abgelegten Nektar während der Reifung des Honigs?

Um diese Fragen zu klären, stellte ich¹⁾ 1916 besondere Versuche an, bei denen die Bienen hauptsächlich mit Zuckersirup gefüttert wurden; dieser Sirup passierte dann noch zweimal den Bienenorganismus. Es wurde nämlich folgendermaßen vorgegangen: beim ersten Versuch erhielten die Bienen 25 Pfund Sirup; nach 2 Tagen wurde der in die Waben abgelegte Zuckerhonig herausgenommen und von neuem an die Bienen verfüttert; der zum zweitenmal abgelegte Honig blieb im Stock bis zum Augenblick des Verschließens der Waben und wurde dann den Bienen wiederum vorgesetzt, der zum drittenmal abgelegte Honig wurde gleich dem ursprünglichen Zuckersirup und den beiden ersten Honigen der chemischen Analyse unterworfen.

Bei der Reifung des Honigs wird der Rohrzucker invertiert; daneben bildet sich eine gewisse Menge dextrinartiger Stoffe, die *Fehlingsche*

¹⁾ E. Sarin, diese Zeitschr. 120, 250, 1921.

Saccharoselösung, wobei es sich erwies, daß die stärkste Wirkung der Vorderdarm ausübte, die schwächste aber der hinterste Teil des Darmes; auch der Honigmagen war sehr wenig aktiv. Daher nimmt *Axenfeld* an, daß nur der Vorderdarm das Ferment enthält. *Petersen*¹⁾ befaßte sich während seiner Studien über die Verdauung der Honigbiene auch mit der Bestimmung von Fermenten in ihren Verdauungsorganen. Im Glycerinauszug des Bienenmagens konnte er folgende Fermente nachweisen: Diastase, Invertase und ein peptolytisches Ferment, das Fibrin löste und Pepton spaltete.

Eigene Untersuchungen.

Die Lebensbedingungen der Biene im Winter unterscheiden sich scharf von denen des Sommers, sowohl in Hinsicht auf die Nahrungsaufnahme, als auch auf die Defäkation. Man kann von vornherein annehmen, daß der Stoffwechsel der Biene in den verschiedenen Jahreszeiten verschiedenartig ist. Ihr geschlechtlicher Dimorphismus, der auf die Arbeitsteilung des Bienenstaates und die Verschiedenheiten der physiologischen Funktionen ihrer Glieder tief einwirkt, kann auch in der Arbeit ihrer Verdauungsorgane zum Ausdruck kommen. Dieser Umstände eingedenk, haben wir im ganzen 795 lebende Bienen, sowohl Arbeiterinnen als auch Drohnen, in verschiedenen Jahreszeiten eingesammelt und der Untersuchung unterworfen. Um die nötige Menge Auszug aus dem Darmkanal zu erhalten, muß man jedesmal mehrere Bienen öffnen. Diese Arbeit wurde (wie das auch bei der vorigen Arbeit geschehen war) von *E. N. Pawlowski* getan, der seinerseits auch die anatomisch-histologische Untersuchung der Verdauungsorgane der Biene ausführte²⁾. Die durch Chloroform oder Äther getöteten Bienen wurden geöffnet und ihr Darmkanal mit Hilfe des Skalpells in folgende Abschnitte zerlegt: a) Honigmagen (Vorderdarm), b) Magen (Mitteldarm), c) Dünndarm (vordere Hälfte vom hinteren Teil des Darmes) und d) Rektum oder Dickdarm (hinteres Ende vom hinteren Teil des Darmes). Jeder einzelne Darmabschnitt wurde von seinem Inhalt befreit und sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, dann in ein entsprechendes Schälchen gebracht, auf dessen Boden sich ein wenig ausgeglühter Seesand befand. Außerdem kamen in jedes Schälchen zwei bis drei Tropfen Glycerin oder einer anderen Flüssigkeit, die man zum Bereiten des Auszugs benutzen wollte. Als nächstes wurde der Inhalt jedes Schälchens mit einem Pistill zerrieben, bis eine gleichförmige Masse entstanden war, worauf in jedes die notwendige Menge Glycerin oder einer andern Flüssigkeit gegeben, alles gut umgerührt und in ein Glas mit eingeschlifffenem Stopfen gegossen wurde. Auf diese Weise wurden

¹⁾ *Petersen*, Pflügers Arch. 145, 121, 1912.

²⁾ *Pawlowski* and *Sarin*, Quarterly Journ. of Microscop. Science 66, Part III, 1922.

sämtliche Auszüge aus den Teilen des Darmes bereitet. Es muß bemerkt werden, daß die Einmündungen der *Malpighischen* Gefäße, wie auch diese Gefäße selbst, bei der Präparierung entfernt wurden und nicht in die Auszüge gerieten; höchstens zufällig konnten vielleicht einige Röhren an der Oberfläche des Darmes nachgeblieben sein. Die bei der Bereitung der Auszüge benutzten Flüssigkeiten waren: a) Glycerin, b) destilliertes Wasser, c) ein Gemisch aus gleichen Teilen der beiden eben genannten Flüssigkeiten, und d) physiologische (0,75 %) Kochsalzlösung. Als Antiseptikum kamen noch einige (5 bis 10) Tropfen Toluol hinzu. Die Gläser wurden einige Male stark umgeschüttelt und blieben dann bei Zimmertemperatur und Lichtabschluß bestimmte Zeiten stehen.

Tabelle I.

Die Zubereitungsarten der Auszüge aus dem Darmkanal der Bienen, die zu den Versuchen benutzt wurden.

Numer des Versuchs	Zeit der Herstellung	Zahl der Bienen, aus denen der Darmkanal herauspräpariert wurde	Flüssigkeits- volumen	Art der Flüssigkeit	Menge v. Toluol in Tropfen
1	23. X. 1916	90 Arbeiterinnen	30	Glycerin	10
2	7. IV. 1917	60 "	25	"	10
3	22. VI.	60 "	25	Wasser	10
4	22. VI.	30 "	12,5	Glycerin	5
5	20. VII.	50 Drohnen	25	"	10
6	21. IX.	40 Arbeiterinnen	20	"	8
7	15. XI.	30 "	30	15 ccm Glyc. + 15 ccm Wasser	10
8	31. III. 1918	30 "	30	15 " " + 15 " "	10
9	31. III.	30 "	30	Wasser	10
10	14. IV.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
11	15. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
12	21. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
13	23. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
14	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
15	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
16	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
17	2. VII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
18	3. VII.	15 Drohnen	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
19	3. VII.	25 Arbeiterinnen	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
20	6. VIII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
21	6. VIII.	15 "	15	Wasser	5
22	6. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
23	6. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
24	20. VIII.	25 "	50	25 ccm Glyc. + 25 ccm Wasser	10
25	20. VIII.	15 "	15	Wasser	5
26	20. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
27	20. VIII.	15 "	15	Physiolog. Kochsalzlösung	5
28	20. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
29	24. X.	25 "	50	25 " " + 25 " "	10
30	24. X.	25 "	50	Wasser	10

Im ganzen: 795 Bienen

Bei allen Reduktionsmethoden zur Zuckerbestimmung macht es sich störend geltend, daß das Oxydationsmittel auch ohne Anwesenheit der Glucose teilweise reduziert wird. Diese sogenannte Eigenreduktion oder Blindwert ist auch bei der Ferricyanidmethode unvermeidlich. Dieser Blindwert beruht unserer Meinung nach auf mehreren verschiedenen Ursachen. Eine von diesen ist die Anwesenheit von Mikroorganismen; so wird die Eigenreduktion groß gefunden werden, wenn man destilliertes Wasser, das unter gewöhnlichen Bedingungen längere Zeit aufbewahrt ist, benutzt. Ferner haben wir mehrmals beobachtet, daß frisch destilliertes Wasser eine eben beobachtbare Reduktion des Ferricyanids, und zwar selbst in der Kälte bewirkt, während Wasser, das einige Tage im Eisschrank aufbewahrt gewesen ist, keine solche Wirkung aufweist. Deshalb haben wir angenommen, daß in frisch destilliertem Wasser eine winzige Spur von Wasserstoffsuperoxyd vorkomme. Früher hatte man den Blindwert, das heißt die Menge von Oxydationsmittel, die in einem Blindversuch reduziert wird, als Korrektion derart berechnet, daß man von dem im eigentlichen Versuch gefundenen Verbrauch an Oxydationsmittel den betreffenden Blindwert subtrahiert. Eine solche Berechnung ist nur erlaubt, wenn der Verbrauch an Oxydationsmittel mit der anwesenden Glucosemenge proportional ist. Dies ist aber meistens, so auch bei der Ferricyanidmethode, nicht der Fall. Wir haben den Blindwert als Glucose zu berechnen vorgezogen, welches dadurch möglich wird, daß die reduzierte Ferricyanidmenge mit der anwesenden Glucosemenge proportional ist, sobald es sich um kleine Glucosemengen handelt.

Um die Relation zwischen anwesender Glucose und reduziertem Ferricyanid zu ermitteln, wurden 0,2000 g Glucose in Wasser bis 1 Liter gelöst; von dieser Lösung wurden 200 ccm abgemessen und auf 1 Liter ergänzt. Von dieser Lösung wurden je sechsmal die folgenden Mengen mit möglichst geeigneter Bürette in Präparatengläser abgemessen:

0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 ccm.

Sämtliche Meßgeräte waren mit Chromsäure-Schwefelsäure sorgfältig gereinigt und mit Wasser ausgewogen worden. Das Volumen wurde durch Zusatz von Wasser auf 12 ccm ergänzt, und zu jedem Präparatenglas wurden schließlich 2 ccm einer 0,005 n Kaliumferricyanidlösung, die gleichzeitig 0,1 Mol. Natriumcarbonat im Liter enthielt, zugesetzt. Nach Mischung wurde im Wasserbade 15 Minuten erhitzt und nach Abkühlung und Zusatz von Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung mit Natriumthiosulfat, dessen Titer gegen $n/200$ KJO_3 sowie $n/200$ J eingestellt war, titriert. Titrierung der 2 ccm Ferricyanidlösung ohne vorherige Erhitzung ergab:

2,00, 1,99, 1,99, 2,00, 2,00, 2,00, Durchschnitt 1,997.

Sämtliche Resultate sind in folgender Tabelle niedergelegt:

Tabelle IV.

Milligramm Glucose abgemessen	Milligramm Glucose korrigiert	0,005 n Kaliumferrieyanid ccm						Durchschnitt
Blindwert 0,000	0,004	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,023
0,020	0,024	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,140
0,040	0,044	0,25	0,26	0,25	0,26	0,25	0,25	0,253
0,080	0,084	0,48	0,48	0,47	0,47	0,46	0,48	0,473
0,120	0,124	0,70	0,69	0,70	0,70	0,70	0,71	0,700
0,160	0,164	0,92	0,94	0,92	0,92	0,94	0,94	0,930
0,200	0,204	1,15	1,16	1,14	1,14	1,16	1,14	1,148
0,240	0,244	1,36	1,36	1,36	1,35	1,36	1,36	1,358
0,280	0,284	1,57	1,57	1,57	1,58	1,57	1,57	1,572
0,320	0,324	1,77	1,76	1,77	1,76	1,77	1,77	1,767
0,360	0,364	1,94	1,93	1,92	1,92	1,93	1,94	1,930

Die Korrektur des Glucosewertes geschieht, nach den oben angegebenen Prinzipien, durch folgende Berechnung (x = Blindwert als Glucose berechnet)

$$\frac{x}{0,020 + x} = \frac{0,023}{0,140}; x = 0,004 \text{ mg Glucose.}$$

Für die weitere Bearbeitung des Zahlenmaterials wurde folgende Formel rechnerisch ermittelt (G , Glucose in Milligrammen; K , Kaliumferrieyanid in Kubikzentimetern 0,005 n).

$$G = 0,1735 \cdot K + \frac{0,0050 K}{2,27 \div K}$$

Die Verwendbarkeit der Formel geht aus folgender Zusammenstellung hervor:

Tabelle V.

Verbraucht ccm 0,005 n Kaliumferrieyanid	Glucose		Differenz
	abgemessen dmg	gefunden dmg	
0,140	0,240	0,246	+ 0,006
0,253	0,440	0,445	+ 0,005
0,473	0,840	0,833	- 0,007
0,700	1,240	1,237	- 0,003
0,930	1,640	1,648	+ 0,008
1,148	2,040	2,043	+ 0,003
1,358	2,440	2,431	- 0,009
1,572	2,840	2,839	- 0,001
1,767	3,240	3,243	+ 0,003
1,930	3,640	3,632	- 0,008
2,000	—	3,840	—

Mit Hilfe der Formel ist eine Tabelle, welche aus praktischen Gründen das Thiosulfat als Eingang benutzt, berechnet und am Schluß dieser Abhandlung angebracht.

Weder die Kaliumferricyanidlösung noch die Natriumthiosulfatlösung ist unter allen Umständen haltbar; es empfiehlt sich daher, eine 0,005 n Kaliumjodatlösung, die unbedingt haltbar ist, vorrätig zu haben und durch diese den Titer der Natriumthiosulfatlösung zu ermitteln. Ein kleiner Fehler im Titer der Ferricyanidlösung wird in den Blindwert aufgenommen und dadurch eliminiert. Um dieses sicherzustellen, sind einige Bestimmungen von bekannten Glucosemengen mit einer 5 % zu schwachen Kaliumferricyanidlösung vorgenommen; hierbei hat man keine Fehler gefunden, wenn die Glucosemenge 0,3 mg nicht übersteigt.

Um die Ferricyanidmethode bei der Bestimmung des Blutzuckers zu benutzen, müssen die Proteinstoffe des Blutes entfernt werden. Keine der besten bekannten Methoden hat sich für unseren Zweck vollständig bewährt; so ist in einigen von unseren Versuchen mit kolloidalem Eisen eine Spur von Eisenverbindungen ins Filtrat geraten. Deshalb haben wir die Fällung der Proteinstoffe mittels frisch gefälltem Zinkhydroxyd und kurzer Erhitzung vorgezogen.

Die Fällung gestaltet sich folgendermaßen: In ein Präparatenglas (15 × 150 mm) wird 1 ccm n/10 NaOH abpipettiert und 5 ccm einer 0,45proz. Zinksulfatlösung zugesetzt, wonach ein gelatinöser Niederschlag aus Zinkhydroxyd entsteht. Der Überschuß des Zinksulfats ist so bemessen, daß die Lösung nie alkalisch wird, selbst wenn die Abpipettierung der Lösungen recht ungenau ausgeführt wird.

Nun wird 0,1 ccm Blut mittels Kapillarpipette abgemessen, in die Zinkhydroxydaufschlammung ausgeblasen und die Pipette zweimal mit der Mischung ausgespült und leergeblasen, wonach das Präparatenglas in siedendem Wasserbade 3 Minuten erhitzt wird. Hierdurch bildet sich ein kristallklares Fluidum, in welchem der Proteinstoff als grobe, graue Koageln herumschwimmt.

Die Mischung wird in einen Glastrichter von 3 bis 4 cm Durchmesser, der mit einem kleinen Filter aus ausgewaschener, mit Wasser naß gemachter, nicht fest angedrückter Baumwolle beschickt ist, eingegossen, während der Trichter in einem Präparatenglas (30 × 90 mm) verweilt. Der Trichter und Filter wird zweimal mit je 3 ccm Wasser ausgewaschen. Nach Zusatz von 2 ccm alkalischer Kaliumferricyanidlösung wird das Glas 15 Minuten in siedendem Wasserbade erhitzt.

Daß die Proteinstoffe in der beschriebenen Weise vollständig entfernt worden waren, geht daraus hervor, daß *Jolles* Probe im Filtrat negativ ausfiel; auch die nach *J. Bangs* Mikromethode im Filtrat ausgeführte N-Bestimmung ergab einen dem normalen „Rest-N“ entsprechenden Wert.

Ferner wurde folgender Kontrollversuch ausgeführt: Von einer Glucoselösung wurde sechsmal 0,1 ccm abgemessen; in drei Proben wurde die Glucose direkt nach der Ferricyanidmethode bestimmt, gefunden:

0,273, 0,274, 0,274 mg. Mittel 0,274 mg. In den anderen drei Proben wurde die Glucose nach Zusatz von Zinkhydroxyd, Erhitzen im Wasserbade, Filtrieren und Auswaschen bestimmt, gefunden: 0,273, 0,274 und 0,275 mg Glucose. Mittel 0,274 mg.

Weiter wurde der Glucosegehalt in einer Probe von Oxalatblut durch 12 Analysen ermittelt. Hiernach sind 20 mg Glucose in einem 25 ccm-Meßkolben abgewogen und mit demselben Blute auf 25 ccm eingestellt worden. Nach Auflösung und guter Mischung wurden wieder 12 Analysen ausgeführt.

Für jede Bestimmung 0.1 ccm Blut	Glucose						Mittel : 0,064
	%	%	%	%	%	%	
	%	%	%	%	%	%	
	0,065	0,063	0,065	0,062	0,063	0,065	
	0,065	0,065	0,063	0,062	0,065	0,062	
	0,145	0,143	0,145	0,143	0,143	0,143	Mittel : 0,143
	0,143	0,143	0,145	0,143	0,141	0,141	
Differenz: 0,079. Sollwert: 0,080.							

Die Präzision der Methode geht ferner aus folgender Analysenreihe hervor:

Für jede Bestimmung 0,1 ccm Blut					„Prozent“ d. h. g in 100 ccm
	0,060	0,060	0,060	0,058	
	0,063	0,060	0,061	0,058	
	0,061	0,061	0,060	0,061	

Die Präzision der Methode ist also eine ganz bedeutende.

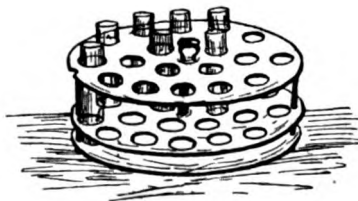
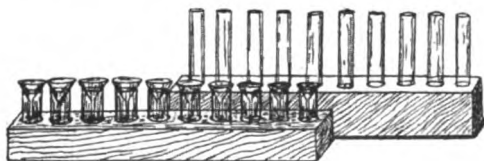
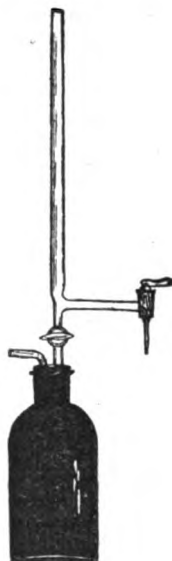
Die Ausführung der Methode erfordert keine besondere Übung. Mit der von uns angegebenen Apparatur lassen sich in einer Stunde 18 Analysen bequem ausführen und berechnen. Aus praktischen Gründen ist es wünschenswert zu wissen, inwiefern ein Stehenlassen der Blutprobe, ehe die Analyse vorgenommen wird, erlaubt ist. Einige Proben sind deshalb teils unmittelbar nach der Probeentnahme, teils später analysiert worden. Das Aufbewahren geschah bei Zimmertemperatur nach dem Filtrieren und Auswaschen. Es wurde gefunden:

	Glucose			Mittel
	‰	‰	‰	
Sofort analysiert	0,084	0,086	0,082	0,084
Nach 50 Stunden analysiert . . .	0,081	0,082	0,084	0,082
„ 100 „	0,084	0,082	—	0,083

Weiter ist untersucht worden, inwieweit es angeht, das Gemisch von Blut und Zinkhydroxyd vor dem Erhitzen stehen zu lassen, wobei eventuell eine Glykolyse eintreten könnte. Die folgenden Versuche zeigen, daß ein Stehenlassen der Proben bis zu einigen Stunden zulässig ist:

Tabelle VI.

Oxalatblut, Mensch		Glucose				Mittel
		‰	‰	‰	‰	
Koaguliert	sofort	0,115	0,115	0,119	0,119	0,117
„	nach ½ Stunde	0,117	0,115	0,115	0,113	0,115
„	„ 3 „	0,115	0,117	0,115	0,117	0,116
„	„ 6 „	0,115	0,117	0,113	0,115	0,115



Die Einrichtung der Apparatur ist aus der Illustration ohne weiteres verständlich. Die automatische 2 ccm-Pipette wird für die alkalische Ferricyanidlösung, die 2 ccm-Bürette, die in 0,02 ccm eingeteilt ist, für die Thiosulfatlösung verwendet. Beim Auswaschen der Fällungsgläser und Filtertrichter benutzt man zweckmäßig große, in 3 ccm eingeteilte Pipetten. Das Spülwasser läßt man an der Wand des Präparatenglases unter Rotieren desselben einfließen.

Beispiel der Berechnung einer Analysenreihe:

Probe Nr.	A Verbraucht ccm Natrium- thiosulfatlösung	B $= A \cdot \frac{2,00}{1,90}$	C Der Tabelle entnommen	C ÷ Blindwert
1	1,26	1,33	0,119	0,111
2	1,32	1,39	0,108	0,100
3	1,00	1,05	0,168	0,160
4	1,16	1,22	0,138	0,130
Blinder Versuch . . .	1,86	1,95	0,008	—
„ „ „ „ „	1,85	—	—	—
2 ccm 0,005 n Jodat .	1,90	—	—	—
2 „ 0,005 n „ .	1,90	—	—	—

Erforderliche Lösungen:

Zur Proteinfällung: NaOH n/10

0,45 % Zinksulfat.

Wenn diese Lösungen eine Zeitlang gestanden haben, wird der Blindwert nach und nach größer. Es empfiehlt sich daher, sie etwa alle 8 Tage aus Stammlösungen frisch herzustellen. Als Stammlösungen kann man passend 2 n NaOH und eine Zinksulfatlösung, die in 100 ccm Lösung 45 g Zinksulfat enthält, vorrätig halten.

Zur Zuckerbestimmung:

1. Eine wässrige Lösung, die in 1 Liter 1,65 g Kaliumferricyanid und 10,6 g ausgeglühtes Natriumcarbonat enthält. Gegen Licht zu schützen.
2. Kaliumjodid-Zinksulfat-Natriumchloridlösung:

Kaliumjodid 5 g
Zinksulfat 10 g
Natriumchlorid 50 g
Wasser bis 200 ccm

Die Lösung ist nicht absolut haltbar, weil das Kaliumjodid gespalten wird. Deshalb empfiehlt es sich, die Lösung ohne Kaliumjodid in großer Menge vorrätig zu haben und nach und nach kleine Portionen mit Kaliumjodid zu bereiten. Ist freies Jod in der Lösung vorhanden, kann dieses mittels Filtrieren durch dickes Filtrierpapier fast vollständig beseitigt werden. Kleinere Fehler werden durch den Blindversuch eliminiert.

3. Essigsäurelösung:

Eisessig 3 ccm
Wasser bis 100 „

Der Eisessig muß eisenfrei sein. Eisessig „Kahlbaum“ hat sich bewährt.

4. Stärkelösung:

1 g lösliche Stärke wird in 100 ccm wässriger, gesättigter Natriumchloridlösung gelöst.

5. Natriumthiosulfatlösung:

0,7 g Natriumthiosulfat werden in 500 ccm Wasser gelöst.

Die Herstellung der Lösungen erfordert keine besondere Sorgfalt. Nur die zur Titerstellung zu benutzende Kaliumjodatlösung muß absolut richtig sein. Sie wird in der Weise hergestellt, daß 0,3566 g wasserfreies Kaliumjodat in Wasser bis 2 Liter gelöst wird.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Mikrozuckerbestimmung mittels Kaliumferricyanid angegeben.

	ccm n/200 Natriumthiosulfat — mg Glucose									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene.

Von

E. Sarin.

(Aus dem Laboratorium für Chemie der Nahrungs- und Genußmittel der Universität Riga.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1922.)

Im Jahre 1873 stellten *Fischer* und *Siebold* bei der Honigbiene fermentausscheidende Speicheldrüsen fest.

Ein Jahr später bewiesen *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾, daß sich sowohl im Organismus der Biene, als auch im Bienenbrot und im Pollen Stoffe befinden, die fermentative Eigenschaften haben. Die genannten Forscher zergliederten 152 Arbeitsbienen in Kopf, Brust und Hinterleib und stellten aus jedem dieser drei Teile einen Glycerinauszug her. Es erwies sich, daß alle drei Auszüge Stärke in Dextrine und Zucker, Saccharose dagegen in Invertzucker verwandelten; dabei zeigten die Auszüge, die aus Kopf und Hinterleib der Bienen bereitet waren, eine weit größere Aktivität als der dritte, aus der Brust bereitete Auszug. Außerdem enthielten die beiden erstgenannten Auszüge noch ein Ferment, das Blutfibrin löste, während der dritte auf Fibrin keine Wirkung ausübte. Die Methodik, deren sich *Erlenmeyer* und *Planta* bei der Bereitung ihrer Auszüge bedienten, ist gänzlich ungeeignet, da der äußeren Zergliederung des Bienenkörpers in Kopf, Brust und Hinterleib keineswegs die Teilung des Darmkanals in charakteristische Abschnitte entspricht. Die Sektion einer Biene ergibt, daß der Vorderdarm den Kopf und die Brust durchzieht und in den Hinterleib mündet, wo er sich mit dem Mitteldarm vereinigt; auch der hintere Darm liegt im Hinterleib. Wegen dieser Lage der Teile des Darmkanals wird beim Abtrennen von Kopf und Brust der Mitteldarm zerstückelt, wobei sein hinteres Ende und alle übrigen Teile des Darmkanals im Hinterleib zurückbleiben. Es ist klar, daß es bei dieser Lage der Dinge unmöglich ist, einigermaßen entscheidende Resultate zu erhalten. Die Hoffnungslosigkeit einer derartigen Methodik wird noch dadurch erhöht, daß sich im Kopfe und in der Brust ein verwickeltes System von Speicheldrüsen befindet. Bei der Untersuchung von Auszügen aus Teilen des Bienenkörpers kann man unmöglich feststellen, welchem seiner Bestandteile diese oder jene Wirkung zuzuschreiben ist, dem Darm, den Speicheldrüsen oder irgend einem anderen Körpergewebe, wie z. B. der Hämolymphe, dem Nervengewebe oder anderen. *Erlenmeyer* und *Planta* bereiteten auch einen Glycerinauszug aus Bienenbrot und zeigten, daß es gleichartige, jedoch stärkere, fermentative Eigenschaften besitzt als die früher erwähnten Auszüge. Auch der frische Pollen verwandelte Stärke in Dextrine und Zucker und Saccharose in Invertzucker.

*Axenfeld*²⁾ wandte eine richtige Methodik an, indem er den Darmkanal der Bienen in drei Teile zergliederte; diese Teile fügte er zu einer

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, Chem. Zentralbl. 1874, S. 790.

²⁾ *Axenfeld*, Zentralbl. f. Physiol. 17, 268, 1903.

Sachharosemangel, wobei es sich erheut, daß die stärkste Wirkung der Vorderdarm, am wenigsten aber der hinterste Teil des Darmes; auch der Honigmagen war sehr wenig aktiv. Dabei nimmt Aronfeld an, daß nur der Vorderdarm das Ferment enthält. Petersen¹ befaßte sich während seiner Studien über die Verdauung der Honigbiene auch mit der Bestimmung von Fermenten in ihren Verdauungsorganen. Im Glycerinauszug des Bienenmagens konnte er folgende Fermente nachweisen: Diastase, Invertase und ein peptolytisches Ferment, das Fibrin löste und Pepton gab.

Eigene Untersuchungen.

Die Lebensbedingungen der Biene im Winter unterscheiden sich scharf von denen des Sommers, sowohl in Hinsicht auf die Nahrungsaufnahme, als auch auf die Defekation. Man kann von vornherein annehmen, daß der Stoffwechsel der Biene in den verschiedenen Jahreszeiten verschiedenartig ist. Ihr geschlechtlicher Dimorphismus, der auf die Arbeitsteilung des Bienenstaates und die Verschiedenheiten der physiologischen Funktionen ihrer Glieder tief einwirkt, kann auch in der Arbeit ihrer Verdauungsorgane zum Ausdruck kommen. Dieser Umstände eingedenk, haben wir im ganzen 795 lebende Bienen, sowohl Arbeiterinnen als auch Drohnen, in verschiedenen Jahreszeiten eingesammelt und der Untersuchung unterworfen. Um die nötige Menge Auszug aus dem Darmkanal zu erhalten, muß man jedesmal mehrere Bienen öffnen. Diese Arbeit wurde (wie das auch bei der vorigen Arbeit geschehen war) von E. N. Pawlowski getan, der seinerseits auch die anatomisch-histologische Untersuchung der Verdauungsorgane der Biene ausführte²). Die durch Chloroform oder Äther getöteten Bienen wurden geöffnet und ihr Darmkanal mit Hilfe des Skalpells in folgende Abschnitte zerlegt: a) Honigmagen (Vorderdarm), b) Magen (Mitteldarm), c) Dünndarm (vordere Hälfte vom hinteren Teil des Darmes) und d) Rektum oder Dickdarm (hinteres Ende vom hinteren Teil des Darmes). Jeder einzelne Darmabschnitt wurde von seinem Inhalt befreit und sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, dann in ein entsprechendes Schälchen gebracht, auf dessen Boden sich ein wenig ausgeglühter Seesand befand. Außerdem kamen in jedes Schälchen zwei bis drei Tropfen Glycerin oder einer anderen Flüssigkeit, die man zum Bereiten des Auszugs benutzen wollte. Als nächstes wurde der Inhalt jedes Schälchens mit einem Pistill zerrieben, bis eine gleichförmige Masse entstanden war, worauf in jedes die notwendige Menge Glycerin oder einer andern Flüssigkeit gegeben, alles gut umgerührt und in ein Glas mit eingeschlifffenem Stopfen gegossen wurde. Auf diese Weise wurden

¹) Petersen, Pflügers Arch. 145, 121, 1912.

²) Pawlowski and Sarin, Quarterly Journ. of Microscop. Science 66, Part III, 1922.

sämtliche Auszüge aus den Teilen des Darmes bereitet. Es muß bemerkt werden, daß die Einmündungen der *Malpighi*schen Gefäße, wie auch diese Gefäße selbst, bei der Präparierung entfernt wurden und nicht in die Auszüge gerieten; höchstens zufällig konnten vielleicht einige Röhrchen an der Oberfläche des Darmes nachgeblieben sein. Die bei der Bereitung der Auszüge benutzten Flüssigkeiten waren: a) Glycerin, b) destilliertes Wasser, c) ein Gemisch aus gleichen Teilen der beiden eben genannten Flüssigkeiten, und d) physiologische (0,75 %) Kochsalzlösung. Als Antiseptikum kamen noch einige (5 bis 10) Tropfen Toluol hinzu. Die Gläser wurden einige Male stark umgeschüttelt und blieben dann bei Zimmer-temperatur und Lichtabschluß bestimmte Zeiten stehen.

Tabelle I.

Die Zubereitungsarten der Auszüge aus dem Darmkanal der Bienen, die zu den Versuchen benutzt wurden.

Nummer des Versuchs	Zeit der Herstellung	Zahl der Bienen, aus denen der Darmkanal herauspräpariert wurde	Flüssigkeitsvolumen	Art der Flüssigkeit	Menge v. Toluol in Tropfen
1	23. X. 1916	90 Arbeiterinnen	30	Glycerin	10
2	7. IV. 1917	60 "	25	"	10
3	22. VI.	60 "	25	Wasser	10
4	22. VI.	30 "	12,5	Glycerin	5
5	20. VII.	50 Drohnen	25	"	10
6	21. IX.	40 Arbeiterinnen	20	"	8
7	15. XI.	30 "	30	15 ccm Glyc. + 15 ccm Wasser	10
8	31. III. 1918	30 "	30	15 " " + 15 " "	10
9	31. III.	30 "	30	Wasser	10
10	14. IV.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
11	15. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
12	21. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
13	23. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
14	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
15	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
16	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
17	2. VII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
18	3. VII.	15 Drohnen	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
19	3. VII.	25 Arbeiterinnen	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
20	6. VIII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
21	6. VIII.	15 "	15	Wasser	5
22	6. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
23	6. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
24	20. VIII.	25 "	50	25 ccm Glyc. + 25 ccm Wasser	10
25	20. VIII.	15 "	15	Wasser	5
26	20. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
27	20. VIII.	15 "	15	Physiolog. Kochsalzlösung	5
28	20. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
29	24. X.	25 "	50	25 " " + 25 " "	10
30	24. X.	25 "	50	Wasser	10
Im ganzen: 795 Bienen					

Die Konzentrationen der Auszüge waren verschieden. Anfangs wurden starke Auszüge benutzt — 90 Bienen auf 30 ccm Flüssigkeit ausgezogen. Im Laufe der weiteren Versuche erwies es sich als zweckentsprechender weniger starke Auszüge zu benutzen, und schließlich blieben wir bei 25 Bienen auf 50 ccm Flüssigkeit. Die Auszüge wurden aus Bienen hergestellt, die in verschiedenen Jahreszeiten eingesammelt worden waren. Im ganzen wurden 30 Versuche ausgeführt, deren Einzelheiten aus Tabelle I zu entnehmen sind.

Die nächstliegende Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die qualitative Bestimmung der Fermente in den verschiedenen Teilen des Darmkanals der Biene; die Fermente der Speicheldrüsen wurden vorläufig nicht berücksichtigt.

Es wurden bestimmt: Katalase, Amylase, Inulinase, Lactase, Invertase, Lipase, Pepsin, Trypsin, Chymosin und Emulsin.

Katalase.

Über das Vorkommen von Katalase im Bienenorganismus finden sich in der Literatur keine Angaben. Zur Bestimmung des Ferments wurden 2 ccm des 24stündigen Auszuges mit 8 ccm Wasser vermischt, filtriert und 10 ccm frisch bereitete 1proz. Wasserstoffsuperoxydlösung hinzugefügt. In einem von mir¹⁾ konstruierten Apparat wurde dann die Menge Sauerstoff festgestellt, die sich in 24 Stunden aus der Mischung entwickelte. Selbstverständlich wurden bei allen Analysen Kontrollversuche angestellt. Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle II wiedergegeben.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Katalase ein spezifisches Sekret des Bienen- und Drohnenmagens ist. Von diesem Teil des Darmkanals wird das Ferment ununterbrochen im Laufe des ganzen Jahres ausgeschieden, während es im Dickdarm nur im Frühling festzustellen war.

Den letztgenannten Umstand kann man dadurch erklären, daß sich die Biene während ihres sechsmonatigen winterlichen Verweilens im Stock nicht entleert und den ganzen Darminhalt bis zum ersten Ausflug im Frühling bei sich behält. Die Kotanhäufung im Dickdarm wird durch eine Katalaseausscheidung begleitet, die anscheinend als Regulator bei verschiedenen Oxydationsprozessen dient und den Überschuß an Peroxyden im interzellularen Stoffwechsel vernichtet. Nach dem ersten dreistündigen Ausflug der Bienen im Frühling findet man im Dickdarm nur sehr wenig Katalase, und nach 2 Tagen ist sie völlig verschwunden, wie die Versuche Nr. 8 und 9 der Tabelle II zeigten.

Interessant und vom praktischen Standpunkt wichtig wäre es, im Vergleich zu unseren Bienenarten, die Frage des Vorkommens von Katalase bei den Bienen des Südens aufzuklären, deren Winterruhe nur eine sehr kurze Zeit dauert.

Man kann von vornherein annehmen, daß sich im Dickdarm der südlichen Bienen kleinere Kotmengen anhäufen als bei den nördlichen Bienen, und daß die Oxydationsprozesse bei den ersteren mit anderer Geschwindigkeit ablaufen als bei den letzteren.

¹⁾ Sarin, Apparat zur Katalasebestimmung. Arbeiten aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratorium des Ackerbauministeriums, S. 11. Petersburg 1913 (russisch).

Tabelle II.
Katalase im Darmkanal der Biene.

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Konzentration und Zusammensetzung des Auszugs	Sauerstoff in ccm			
			Honigmagen	Magen	Dünndarm	Dickdarm
1	8. IV. 1917	60 Bienenmagen in 25 ccm Glyc.	0	6,5	0	2,0
2	23. VI.	30 " " 12,5 " "	0	1,5	0	0
3	16. XI.	30 " " 15 " " + 15 ccm Wasser	0	1,3	0	0
4	1. IV. 1918	30 " " 15 " " + 15 " "	0	11,5	0	3,5
5	1. IV.	30 " " 30 " Wasser	0	9,5	0	2,0
6	15. IV.	15 " " 7,5 " Glyc. + 7,5 " "	0	7,3	0	3,3
7	15. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	13,2	0	2,8
8 ¹⁾	22. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	5,3	0	0,3
9	24. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	7,0	0	0
10	19. VI.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	9,2	0	0
11	2. VII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	3,0	0	0
12	4. VII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	2,0	0	0
13	4. VII.	15 Drohnenmagen, 7,5 " " + 7,5 " "	0	2,5	0	0
14	7. VIII.	25 Bienenmagen, 25 " " + 25 " "	0	8,5	0	0
15	21. VIII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	4,0	0	0

Durch eine diesbezügliche Untersuchung könnte vielleicht aufgeklärt werden, warum es nicht möglich ist, städtische Bienen im Norden zu akklimatisieren. Wenn sie in den Norden übergeführt werden, so kommen sie in die ihnen ungewohnten Bedingungen der langen Winterruhe, und folglich häufen sich in ihrem Dickdarm große Kotmengen an. Es ist verständlich, daß ihr Organismus, der an solche Bedingungen nicht angepaßt ist, verschiedenen Erkrankungen ausgesetzt ist, unter denen verheerende Durchfälle wohl den ersten Platz einnehmen.

Um festzustellen, ob die Sekrete der verschiedenen Teile des Darmkanals bei einer gegenseitigen Mischung einander nicht stimulieren, bestimmten wir die Menge Katalase bei allen möglichen Kombinationen der Auszüge: in jedem einzelnen Falle wurden je 2 ccm der unten erwähnten Auszüge benutzt:

	Frühling 1. IV. 1918 ccm	Sommer 4. VII. 1918 ccm
A Honigmagen + Dünndarm + Dickdarm . . .	4,0	0
B " + "	0,0	0
C " + Dickdarm	4,0	0
D Dünndarm + "	3,9	0

Diese Versuche zeigen, daß im Frühling Katalase, außer vom Magen, nur noch vom Dickdarm ausgeschieden wird (Versuche A, C, D). Die übrigen zwei Abschnitte des Darmkanals (Honigmagen und Dünndarm)

¹⁾ Für den Versuch Nr. 8 sind solche Bienen genommen worden, die bereits ihren ersten Frühjahrsausflug gemacht hatten, wobei der Inhalt des Dickdarms entleert worden war.

werden, wobei auch die im Gemisch mit anderen B. Katalase aus: zu erhalten ist, durch die normale Nahrungsaufnahme der Bienen, wird die Fermentaktivität im Magen erzeugt. Um den Einfluß der Auszugstiefe der Darmteile auf die Aktivität der Katalase zu studieren, wurden verschiedene Fermente untersucht. In einer Portion wurden die einzelnen Teile des Darmkanals mit frisch ausgepresstem Saft und unter Zugabe einiger Tropfen Glycerin sorgfältig verrieben; die erhaltene Emulsion wurde mit einem Teil des 30 ccm Teile Wasser und Glycerin verflüssigt und 200 Tropfen T. hinzugefügt. Zur Bereitung der zweiten Portion wurden diese Teile des Darmkanals bearbeitet, nur wurden die Stückchen nicht verrieben, sondern so, wie sie waren, in ein Glycerin-Wassergemisch gegeben.

In der Tabelle III sind die Zeitabschnitte der Katalaseeinwirkung, sowie die Funktionen der Bestimmung angegeben.

Tabelle III.

Einfluß der Dauer der Extraktion aus dem Darmkanal auf die Aktivität der Katalase im Zusammenhang mit der Herstellungsweise des Auszugs.

Nummer des Auszugs des Versuches	Zeitabschnitt und Zusammen- setzung des Auszugs	Der Teil des Darmkanals	Die Dauer der Extraktion aus den Teilen des Darmkanals in verriebenem sowie unverriebenem Zustande									
			1/2 Stunde	24 Stunden	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	7 Tage	12 Tage	14 Tage	30 Tage
			Sauerstoff in ccm									
16	15 Bienen- därme in 30 ccm Gly- cerin + 30 ccm Wasser	Verriebene	Honig- magen	0	0	—	0	—	—	—	—	—
16 a		Unverriebene	Magen	0	0	—	0	—	—	—	—	—
17		Verriebene	Magen	9,2	9,2	—	6,0	—	—	3,0	—	1,0
17 a		Unverriebene		3,7	16,7	—	22,0	—	—	21,0	—	5,0
18		Verriebene	Dünn- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
18 a		Unverriebene	Dünn- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
19		Verriebene	Dick- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
19 a		Unverriebene	Dick- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
20	25 Bienen- därme in 50 ccm Glycerin + 50 ccm Wasser	Verriebene	Magen	4,5	3,8	3,0	2,4	2,5	2,5	—	—	2,2
20 a		Unverriebene		1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	—	—	0,2
21	25 Bienen- därme in 50 ccm Glycerin + 50 ccm Wasser	Verriebene	Magen	2,0	1,8	2,0	1,2	—	—	—	1,2	—
21 a		Unverriebene		1,0	1,3	2,2	2,0	—	—	—	0,5	—

Aus den Daten der Tabelle läßt sich folgendes ersehen:

Katalase wird, wie gewöhnlich, nur vom Bienenmagen produziert. Die Menge des Ferments ist äußerst verschieden, je nachdem der Auszug aus verriebenem oder nicht verriebenem Teilen hergestellt ist. Im ersten Auszuge (Nr. 17) ließ sich nach halbstündigem Stehen fast die dreifache Menge nachweisen als im zweiten (Nr. 17 a).

Die Aktivität des Ferments in den nächstfolgenden Tagen war in beiden Fällen sehr verschieden. Im Auszuge aus den verriebenen Magen fiel die Aktivität beständig bis zum völligen Verschwinden, das nach 30 Tagen festgestellt werden konnte. Bei dem Parallelversuch mit nicht

verriebeinem Magen dagegen nahm die Aktivität der Katalase mit der Auszugsdauer schnell zu. So war die Wirkung des Ferments schon nach 24 Stunden viermal stärker geworden, als sie am Anfang war, am 3. Tage fast um das Sechsfache, erst vom 7. Tage an fing die Aktivität an, äußerst schnell zu sinken.

Diese Verschiedenheit in der Aktivität erkläre ich durch die verschiedene Bereitungsweise der Auszüge. Beim sorgfältigen Verreiben des Magens werden seine Gewebezellen zerstört und es wird die maximale Katalasemenge frei, die mit der Dauer des Stehens inaktiv zu werden anfängt. Wenn dagegen die Stückchen des Magens nicht verrieben werden und folglich nur eine kleine Anzahl seiner Zellen zerstört wird, so kann nur eine kleine Fermentmenge in Lösung gehen, deren Aktivität zunimmt.

Das kann auf zweierlei Art erklärt werden: entweder fahren die unzerstörten Zellen des Magens fort, Katalase zu entwickeln, oder ihre Menge bleibt dieselbe und geht während des Stehens allmählich aus dem Gewebe in die Flüssigkeit über.

Die beiden nächsten Parallelversuche (Nr. 20, 20a und Nr. 21, 21a), die zur Bestätigung des eben Angeführten unternommen wurden, ergaben ein etwas anderes Bild. Bei den aus verriebenen Magen hergestellten Auszügen konnte die Tatsache der sofortigen Ausscheidung größerer Katalasemengen bestätigt werden, ebenso auch die allmähliche Abnahme der Aktivität. Doch konnte eine Zunahme der Fermentwirkung bei den Auszügen aus nicht verriebenen Magen nur in Nr. 21a nachgewiesen werden, wo am 2. Tage die Aktivität doppelt so groß geworden war. Dagegen konnte bei Versuch Nr. 20a keine Zunahme der Wirkung gefunden werden: 5 Tage stand die Aktivität auf derselben Höhe.

Die angeführten Versuche zeigen, daß die Wirkung der Katalase sehr mannigfaltig ist, was von einer ganzen Reihe von Bedingungen abhängt, unter denen die Individualität des Stoffwechsels der Biene wohl den ersten Platz einnimmt. Die Aufklärung dieser Bedingungen muß einer besonderen Arbeit vorbehalten bleiben.

Amylase.

Die Gegenwart von Amylase im Bienenorganismus wurde von *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾ und von *Petersen*²⁾ nachgewiesen.

Bei unseren Versuchen benutzten wir Auszüge, deren Bereitung auf S. 61 beschrieben wurde.

Zu 2 ccm dieser Auszüge kamen 0,1 ccm einer 0,5proz. Lösung löslicher Stärke, 8 ccm Wasser und zwei Tropfen Toluol, dann wurden die Probierröhrchen auf eine Stunde in ein Wasserbad von 45° C gestellt. Nach dieser Zeit wurden sie herausgenommen, abgekühlt und tropfenweise mit einer Jod-Jodkalilösung versetzt.

Alle Auszüge aus den Bienenmagen ergaben ein positives Resultat: nach dem Hinzufügen von Jodlösung färbten sich alle hellgelb; die Auszüge aus den drei anderen Teilen des Darmkanals, nämlich aus dem Honigmagen, Dünn- und Dickdarm enthielten dagegen keine Amylase: das Gemisch wurde beim Versetzen mit Jod blau.

Unsere Versuche ergeben also, daß Amylase nur im Magen der Biene zu finden ist, während die anderen Teile des Darmkanals dieses Ferment

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, l. c.

²⁾ *Petersen*, l. c.

Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Die Funktion der Bienen ist also nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Verdauung.

Die Funktion der Bienen ist also nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Die Funktion der Bienen ist also nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Die Funktion der Bienen ist also nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Leben.

Die Funktion der Bienen ist also nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Die Funktion der Bienen ist also nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation. Es ist also nicht möglich, dass die Funktion der Bienen nicht nur die der Verdauung, sondern auch die der Assimilation ist.

Invertase.

Invertase wurde ebenfalls nur im Magen der Biene nachgewiesen. Weiterhin wird dieses Ferment werde ich in einer anderen Arbeit mitteilen.

Lipase.

Als Fettahrung kommt für die Biene hauptsächlich das Bienenbrot in Betracht, das nach unseren Untersuchungen bis 6% Fettstoffe enthält. Die Frage, ob die Fettstoffe des Bienenbrots vom Bienenorganismus assimiliert werden, konnte bis jetzt nicht als gelöst angesehen werden, da in der Literatur keinerlei Angaben über das Vorkommen von Lipase im Bienenkörper vorliegen (Petersen¹⁾), denn es nicht gelang, in den Epithelzellen des Verdauungstraktes der Biene durch Osmiumsäure und den Farbstoff Sudan III Fett nachzuweisen, sagt: „Als sicher darf ich wohl hinstellen, daß das meiste Fett, nach der normalen Nahrung, den Darm passiert, ohne gespalten oder resorbiert zu werden.“

¹⁾ Petersen, L. c.

Um Lipase festzustellen, benutzten wir 1proz. Lösung von Monobutyryn und Emulsionen aus Provenceröl. Zu 10 ccm der Monobutyrynlösung oder der Emulsion wurden je 2 ccm der auf Lipase zu prüfenden Auszüge und drei Tropfen Toluol zugesetzt. Die Röhrenchen mit den Flüssigkeiten kamen auf 48 Stunden in einen Thermostaten von 35 bis 38° C, worauf die Proben mit n/10 Natronlauge bei Gegenwart von Phenolphthalein als Indikator titriert wurden; die Ölemulsionen erhielten vor dem Titrieren noch 10 ccm eines vorher neutralisierten Gemisches aus Äther und Alkohol.

Alle ausgeführten Versuche ergaben im allgemeinen gleiche Resultate. Nur die Röhrenchen, die Auszüge aus dem Magen enthielten, wiesen eine Zunahme der Azidität auf, sowohl bei der Monobutyrynlösung als auch bei der Emulsion; diese Zunahme schwankte bei unseren Versuchen zwischen 0,3 bis 0,6 ccm n/10 NaOH, wobei das Ferment auf Monobutyryn eine stärkere Wirkung ausübte als auf Olivenöl.

Auszüge aus anderen Teilen des Darmkanals hatten dagegen auf die Azidität der Probelösungen keinen merkbaren Einfluß.

Aus diesen Versuchen läßt sich daher der Schluß ziehen, daß der Bienen- und Drohnenmagen neben anderen Fermenten auch Lipase ausscheidet; die Biene kann also auch Fette assimilieren.

Pepsin.

Um dieses Ferment festzustellen, benutzten wir folgende Methoden:

1. Eine sterile 10proz. Gelatinelösung wurde mit Salzsäure angesäuert und in dünne Probierröhren verteilt (2 ccm in jedes). In jedes Röhrenchen kamen 2 ccm der zu prüfenden Auszüge und drei Tropfen Toluol. Das Gemisch wurde in einen Thermostaten von 35 bis 38° C gestellt und alle 24 Stunden beobachtet, wie weit die Gelatine bei Abkühlung erstarrte.

2. Ein Stück Blutfibrin wurde in ein Gemisch aus 8 ccm sterilen Wassers (mit Salzsäure angesäuert), 2 ccm der auf Pepsin zu untersuchenden Auszüge und drei Tropfen Toluol getaucht und kam dann in einen Thermostaten von 35 bis 38° C.

3. Es wurde eine 1proz. Caseinlösung bereitet, die im Liter 16 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,124 enthielt. 10 ccm dieser Caseinlösung wurden mit 2 ccm der zu prüfenden Extrakte versetzt und auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38 bis 40° C gestellt. Nach dieser Zeit wurde tropfenweise eine konzentrierte Natriumacetatlösung hinzugefügt.

Diese drei Methoden gaben in allen Fällen übereinstimmende Resultate: Pepsin wurde nur im Bienen- und Drohnenmagen festgestellt; die übrigen Teile des Darmkanals enthielten es nicht.

1. Gelatine, die mit Extrakten aus Bienen-Drohnenmagen versetzt war, verlor die Fähigkeit zu erstarren nach 1 bis 3 Tagen, während Extrakte aus den übrigen Teilen des Darmkanals auch nach 20 Tagen keinen bemerkbaren Einfluß auf den Erstarrungsgrad der Gelatine ausübten¹⁾.

2. In den Röhrenchen, in denen sich Auszüge aus dem Magen befanden, löste sich Fibrin innerhalb 1 bis 3 Tagen; in den übrigen Röhrenchen wurde

¹⁾ Um festzustellen, ob das verflüssigte Gelatinegemisch und die Fibrinlösung steril geblieben waren, wurden Impfungen auf schräg erstarrtem Agar gemacht: nach 36stündigem Verweilen bei 37° C wurde keine Entwicklung von Bakterien beobachtet.

es auch nach 20 Tagen nicht verändert. Nach dieser Zeit wurde sowohl in 1. als auch in 2. der Versuch abgebrochen.

3. Auch die Caseinprobe gab eine positive Reaktion nur bei Extrakten aus dem Magen.

Aus dem oben Angeführten kann man daher schließen, daß der Bienen- und Drohnenmagen ein peptisches Ferment enthält, das in saurer Lösung seine Wirkung äußert, während der Honigmagen, der Dünndarm, sowie auch der Dickdarm mit den Rektaldrüsen kein derartiges Ferment ausscheiden.

Trypsin.

Um Trypsin festzustellen, wurden folgende zwei Lösungen benutzt:

1. Eine alkalische 10proz. Gelatinelösung, wie bei der Pepsinbestimmung; die Verflüssigung erfolgte nach 1 bis 3 Tagen, und zwar nur bei den Extrakten aus dem Magen.

2. Eine alkalische Caseinlösung: 10 ccm einer 1proz. Lösung von Casein, die auf 200 ccm zehn Tropfen einer 10proz. Sodalösung enthielt, wurden mit 2 ccm der zu prüfenden Auszüge versetzt; das Gemisch kam auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38 bis 40° C, worauf tropfenweise 0,5proz. Essigsäurelösung zugefügt wurde: falls das Casein unverändert geblieben war, entstand eine Trübung.

Die beiden beschriebenen Methoden ergaben in allen Fällen gleiche Resultate, wobei Trypsin nur im Magen der Biene und Drohne gefunden wurde, während andere Teile des Darmkanals dieses Ferment nicht enthielten.

Chymosin.

In der Literatur findet man nichts über das Vorkommen von Chymosin im Bienenorganismus.

Zur Bestimmung dieses Ferments wurde ein Gemisch aus 10 ccm Milch + 9 ccm Wasser + 1 ccm 10proz. Chlorcalciumlösung hergestellt. 10 ccm dieses Gemisches wurden mit 1 ccm der zu prüfenden Auszüge versetzt und darauf in ein Wasserbad von 40° C gestellt. Extrakte aus dem Magen koagulierten Milch, und zwar stets, wobei sich bei den von uns ausgeführten Versuchen das Koagulum nicht früher als nach 2, und nicht später als nach 15 Minuten bildete. Dagegen konnte bei Auszügen aus anderen Teilen des Darmkanals keine Koagulation bemerkt werden, selbst nicht nach dreistündigem Stehen; nach dieser Zeit wurde der Versuch abgebrochen.

Die Versuche zeigen also, daß sich im Magen der Biene und Drohne ein Labferment von bedeutender Aktivität befindet.

Emulsin.

Es wurden von Amygdalin, Salicin und Arbutin 1proz. Lösungen hergestellt.

25 ccm jeder Lösung wurden mit 5 ccm des entsprechenden Extrakts und fünf Tropfen Toluol versetzt und kamen dann in einen Thermostaten von 36 bis 40° C. Nach 24 bis 48 bis 72 Stunden konnte keine Glykosid-

spaltung beobachtet werden: die Flüssigkeiten reduzierten nicht *Fehlingsche* Lösung, und beim Amygdalin konnte auch nicht der charakteristische Blausäuregeruch wahrgenommen werden.

Es erweist sich, daß unter unseren Versuchsbedingungen im Darmkanal der Biene keine Fermente gefunden wurden, die Amygdalin, Salicin oder Arbutin spalteten.

Schlußbetrachtung.

Betrachten wir noch zum Schluß die Verteilung der oben angeführten Fermente auf die Abschnitte des Darmkanals der Biene (Tab. IV). Wenn man die verschiedenen Lebens- und Nahrungsbedingungen der Arbeitsbienen und Drohnen in Betracht zieht, so könnte man meinen, daß auch die von ihrem Darm erzeugten Fermente verschieden seien. Parallelversuche ergaben jedoch unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen keinerlei Unterschiede in den Fermentausscheidungen der Arbeitsbienen und Drohnen.

Sämtliche gefundenen Fermente wurden nur im Magen der Biene festgestellt. Die Tatsache, daß nur der Mitteldarm der Biene Fermente ausscheidet, ist völlig analog der Erscheinung, die man auch bei anderen Insekten beobachtet, da sich bei allen Arthropoden die hauptsächlichsten Verdauungsprozesse im Mitteldarm und im Hepatopankreas abspielen.

Tabelle IV.

Gesamttabelle der in verschiedenen Teilen des Darmkanals der Arbeitsbiene und der Drohne gefundenen Fermente.

	Honig- magen	Magen	Dünn- darm	Dick- darm	Bemerkungen
Katalase	—	+	—	○	○ Man findet sie im Dickdarme nur während der zweiten Hälfte des Winters.
Amylase	—	+	—	—	
Inulinase	—	—	—	—	
Lactase	—	—	—	—	
Invertase	—	+	—	—	
Lipase	—	+	—	—	
Pepsin	—	+	—	—	
Trypsin	—	+	—	—	
Chymosin	—	+	—	—	
Emulsin	—	—	—	—	

+ bedeutet beständige Anwesenheit des Ferments.

○ bedeutet beständige Anwesenheit des Ferments nur in bestimmten Zeiten.

— bedeutet Abwesenheit des Ferments.

Bei der Betrachtung der obenstehenden Tabelle IV fällt es auf, daß Katalase in den Extrakten aus dem Dickdarm nicht immer gefunden wird. Das scheint eine gewisse Dissonanz in die Resultate der Arbeit zu bringen und widerspricht allgemein anerkannten Tatsachen. Doch

3. Essigsäurelösung:

Eisessig 3 ccm
Wasser bis 100 „

Der Eisessig muß eisenfrei sein. Eisessig „Kahlbaum“ hat sich bewährt.

4. Stärkelösung:

1 g lösliche Stärke wird in 100 ccm wässriger, gesättigter Natriumchloridlösung gelöst.

5. Natriumthiosulfatlösung:

0,7 g Natriumthiosulfat werden in 500 ccm Wasser gelöst.

Die Herstellung der Lösungen erfordert keine besondere Sorgfalt.

Nur die zur Titerstellung zu benutzende Kaliumjodatlösung muß absolut richtig sein. Sie wird in der Weise hergestellt, daß 0,3566 g wasserfreies Kaliumjodat in Wasser bis 2 Liter gelöst wird.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Mikrozuckerbestimmung mittels Kaliumferrieyanid angegeben.

	ccm n/200 Natriumthiosulfat — mg Glucose									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene.

Von

E. Sarin.

(Aus dem Laboratorium für Chemie der Nahrungs- und Genußmittel der Universität Riga.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1922.)

Im Jahre 1873 stellten *Fischer* und *Siebold* bei der Honigbiene ferment-ausscheidende Speicheldrüsen fest.

Ein Jahr später bewiesen *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾, daß sich sowohl im Organismus der Biene, als auch im Bienenbrot und im Pollen Stoffe befinden, die fermentative Eigenschaften haben. Die genannten Forscher zergliederten 152 Arbeitsbienen in Kopf, Brust und Hinterleib und stellten aus jedem dieser drei Teile einen Glycerinauszug her. Es erwies sich, daß alle drei Auszüge Stärke in Dextrine und Zucker, Saccharose dagegen in Invertzucker verwandelten; dabei zeigten die Auszüge, die aus Kopf und Hinterleib der Bienen bereitet waren, eine weit größere Aktivität als der dritte, aus der Brust bereitete Auszug. Außerdem enthielten die beiden erstgenannten Auszüge noch ein Ferment, das Blutfibrin löste, während der dritte auf Fibrin keine Wirkung ausübte. Die Methodik, deren sich *Erlenmeyer* und *Planta* bei der Bereitung ihrer Auszüge bedienten, ist gänzlich ungeeignet, da der äußeren Zergliederung des Bienenkörpers in Kopf, Brust und Hinterleib keineswegs die Teilung des Darmkanals in charakteristische Abschnitte entspricht. Die Sektion einer Biene ergibt, daß der Vorderdarm den Kopf und die Brust durchzieht und in den Hinterleib mündet, wo er sich mit dem Mitteldarm vereinigt; auch der hintere Darm liegt im Hinterleib. Wegen dieser Lage der Teile des Darmkanals wird beim Abtrennen von Kopf und Brust der Mitteldarm zerstückelt, wobei sein hinteres Ende und alle übrigen Teile des Darmkanals im Hinterleib zurückbleiben. Es ist klar, daß es bei dieser Lage der Dinge unmöglich ist, einigermaßen entscheidende Resultate zu erhalten. Die Hoffnungslosigkeit einer derartigen Methodik wird noch dadurch erhöht, daß sich im Kopfe und in der Brust ein verwickeltes System von Speicheldrüsen befindet. Bei der Untersuchung von Auszügen aus Teilen des Bienenkörpers kann man unmöglich feststellen, welchem seiner Bestandteile diese oder jene Wirkung zuzuschreiben ist, dem Darm, den Speicheldrüsen oder irgend einem anderen Körpergewebe, wie z. B. der Hämolymphe, dem Nervengewebe oder anderen. *Erlenmeyer* und *Planta* bereiteten auch einen Glycerinauszug aus Bienenbrot und zeigten, daß es gleichartige, jedoch stärkere, fermentative Eigenschaften besitzt als die früher erwähnten Auszüge. Auch der frische Pollen verwandelte Stärke in Dextrine und Zucker und Saccharose in Invertzucker.

*Axenfeld*²⁾ wandte eine richtige Methodik an, indem er den Darmkanal der Bienen in drei Teile zergliederte; diese Teile fügte er zu einer

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, Chem. Zentralbl. 1874, S. 790.

²⁾ *Axenfeld*, Zentralbl. f. Physiol. 17, 268, 1903.

Saccharoselösung, wobei es sich erwies, daß die stärkste Wirkung der Vorderdarm ausübte, die schwächste aber der hinterste Teil des Darmes; auch der Honigmagen war sehr wenig aktiv. Daher nimmt *Axenfeld* an, daß nur der Vorderdarm das Ferment enthält. *Petersen*¹⁾ befaßte sich während seiner Studien über die Verdauung der Honigbiene auch mit der Bestimmung von Fermenten in ihren Verdauungsorganen. Im Glycerinauszug des Bienenmagens konnte er folgende Fermente nachweisen: Diastase, Invertase und ein peptolytisches Ferment, das Fibrin löste und Pepton spaltete.

Eigene Untersuchungen.

Die Lebensbedingungen der Biene im Winter unterscheiden sich scharf von denen des Sommers, sowohl in Hinsicht auf die Nahrungsaufnahme, als auch auf die Defäkation. Man kann von vornherein annehmen, daß der Stoffwechsel der Biene in den verschiedenen Jahreszeiten verschiedenartig ist. Ihr geschlechtlicher Dimorphismus, der auf die Arbeitsteilung des Bienenstaates und die Verschiedenheiten der physiologischen Funktionen ihrer Glieder tief einwirkt, kann auch in der Arbeit ihrer Verdauungsorgane zum Ausdruck kommen. Dieser Umstände eingedenk, haben wir im ganzen 795 lebende Bienen, sowohl Arbeiterinnen als auch Drohnen, in verschiedenen Jahreszeiten eingesammelt und der Untersuchung unterworfen. Um die nötige Menge Auszug aus dem Darmkanal zu erhalten, muß man jedesmal mehrere Bienen öffnen. Diese Arbeit wurde (wie das auch bei der vorigen Arbeit geschehen war) von *E. N. Pawlowski* getan, der seinerseits auch die anatomisch-histologische Untersuchung der Verdauungsorgane der Biene ausführte²⁾. Die durch Chloroform oder Äther getöteten Bienen wurden geöffnet und ihr Darmkanal mit Hilfe des Skalpell in folgende Abschnitte zerlegt: a) Honigmagen (Vorderdarm), b) Magen (Mitteldarm), c) Dünndarm (vordere Hälfte vom hinteren Teil des Darmes) und d) Rektum oder Dickdarm (hinteres Ende vom hinteren Teil des Darmes). Jeder einzelne Darmabschnitt wurde von seinem Inhalt befreit und sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, dann in ein entsprechendes Schälchen gebracht, auf dessen Boden sich ein wenig ausgeglühter Seesand befand. Außerdem kamen in jedes Schälchen zwei bis drei Tropfen Glycerin oder einer anderen Flüssigkeit, die man zum Bereiten des Auszugs benutzen wollte. Als nächstes wurde der Inhalt jedes Schälchens mit einem Pistill zerrieben, bis eine gleichförmige Masse entstanden war, worauf in jedes die notwendige Menge Glycerin oder einer andern Flüssigkeit gegeben, alles gut umgerührt und in ein Glas mit eingeschlifffenem Stopfen gegossen wurde. Auf diese Weise wurden

¹⁾ *Petersen*, Pflügers Arch. 145, 121, 1912.

²⁾ *Pawlowski* and *Sarin*, Quarterly Journ. of Microscop. Science 66, Part III, 1922.

sämtliche Auszüge aus den Teilen des Darmes bereitet. Es muß bemerkt werden, daß die Einmündungen der *Malpighi*ischen Gefäße, wie auch diese Gefäße selbst, bei der Präparierung entfernt wurden und nicht in die Auszüge gerieten; höchstens zufällig konnten vielleicht einige Röhrchen an der Oberfläche des Darmes nachgeblieben sein. Die bei der Bereitung der Auszüge benutzten Flüssigkeiten waren: a) Glycerin, b) destilliertes Wasser, c) ein Gemisch aus gleichen Teilen der beiden eben genannten Flüssigkeiten, und d) physiologische (0,75 %) Kochsalzlösung. Als Antiseptikum kamen noch einige (5 bis 10) Tropfen Toluol hinzu. Die Gläser wurden einige Male stark umgeschüttelt und blieben dann bei Zimmertemperatur und Lichtabschluß bestimmte Zeiten stehen.

Tabelle I.

Die Zubereitungsarten der Auszüge aus dem Darmkanal der Bienen, die zu den Versuchen benutzt wurden.

Nummer des Versuchs	Zeit der Herstellung	Zahl der Bienen, aus denen der Darmkanal herauspräpariert wurde	Flüssigkeitsvolumen	Art der Flüssigkeit	Menge v. Toluol in Tropfen
1	23. X. 1916	90 Arbeiterinnen	30	Glycerin	10
2	7. IV. 1917	60 "	25	"	10
3	22. VI.	60 "	25	Wasser	10
4	22. VI.	30 "	12,5	Glycerin	5
5	20. VII.	50 Drohnen	25	"	10
6	21. IX.	40 Arbeiterinnen	20	"	8
7	15. XI.	30 "	30	15 ccm Glyc. + 15 ccm Wasser	10
8	31. III. 1918	30 "	30	15 " " + 15 " "	10
9	31. III.	30 "	30	Wasser	10
10	14. IV.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
11	15. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
12	21. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
13	23. IV.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
14	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
15	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
16	17. VI.	15 "	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
17	2. VII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
18	3. VII.	15 Drohnen	15	7,5 " " + 7,5 " "	5
19	3. VII.	25 Arbeiterinnen	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
20	6. VIII.	25 "	50	7,5 " " + 7,5 " "	10
21	6. VIII.	15 "	15	Wasser	5
22	6. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
23	6. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
24	20. VIII.	25 "	50	25 ccm Glyc. + 25 ccm Wasser	10
25	20. VIII.	15 "	15	Wasser	5
26	20. VIII.	15 "	15	Glycerin	5
27	20. VIII.	15 "	15	Physiolog. Kochsalzlösung	5
28	20. VIII.	15 "	15	7,5 ccm Glyc. + 7,5 ccm Wasser	5
29	24. X.	25 "	50	25 " " + 25 " "	10
30	24. X.	25 "	50	Wasser	10
Im ganzen: 795 Bienen					

Die Konzentrationen der Auszüge waren verschieden. Anfangs wurden starke Auszüge benutzt — 90 Bienen auf 30 ccm Flüssigkeit ausgezogen. Im Laufe der weiteren Versuche erwies es sich als zweckentsprechender weniger starke Auszüge zu benutzen, und schließlich blieben wir bei 25 Bienen auf 50 ccm Flüssigkeit. Die Auszüge wurden aus Bienen hergestellt, die in verschiedenen Jahreszeiten eingesammelt worden waren. Im ganzen wurden 30 Versuche ausgeführt, deren Einzelheiten aus Tabelle I zu entnehmen sind.

Die nächstliegende Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die qualitative Bestimmung der Fermente in den verschiedenen Teilen des Darmkanals der Biene; die Fermente der Speicheldrüsen wurden vorläufig nicht berücksichtigt.

Es wurden bestimmt: Katalase, Amylase, Inulinase, Lactase, Invertase, Lipase, Pepsin, Trypsin, Chymosin und Emulsin.

Katalase.

Über das Vorkommen von Katalase im Bienenorganismus finden sich in der Literatur keine Angaben. Zur Bestimmung des Ferments wurden 2 ccm des 24stündigen Auszuges mit 8 ccm Wasser vermischt, filtriert und 10 ccm frisch bereitete 1proz. Wasserstoffsuperoxydlösung hinzugefügt. In einem von mir¹⁾ konstruierten Apparat wurde dann die Menge Sauerstoff festgestellt, die sich in 24 Stunden aus der Mischung entwickelte. Selbstverständlich wurden bei allen Analysen Kontrollversuche angestellt. Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle II wiedergegeben.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Katalase ein spezifisches Sekret des Bienen- und Drohnenmagens ist. Von diesem Teil des Darmkanals wird das Ferment ununterbrochen im Laufe des ganzen Jahres ausgeschieden, während es im Dickdarm nur im Frühling festzustellen war.

Den letztgenannten Umstand kann man dadurch erklären, daß sich die Biene während ihres sechsmonatigen winterlichen Verweilens im Stook nicht entleert und den ganzen Darminhalt bis zum ersten Ausflug im Frühling bei sich behält. Die Kotanhäufung im Dickdarm wird durch eine Katalaseausscheidung begleitet, die anscheinend als Regulator bei verschiedenen Oxydationsprozessen dient und den Überschuß an Peroxyden im interzellularen Stoffwechsel vernichtet. Nach dem ersten dreistündigen Ausflug der Bienen im Frühling findet man im Dickdarm nur sehr wenig Katalase, und nach 2 Tagen ist sie völlig verschwunden, wie die Versuche Nr. 8 und 9 der Tabelle II zeigten.

Interessant und vom praktischen Standpunkt wichtig wäre es, im Vergleich zu unseren Bienenarten, die Frage des Vorkommens von Katalase bei den Bienen des Südens aufzuklären, deren Winterruhe nur eine sehr kurze Zeit dauert.

Man kann von vornherein annehmen, daß sich im Dickdarm der südlichen Bienen kleinere Kotmengen anhäufen als bei den nördlichen Bienen, und daß die Oxydationsprozesse bei den ersteren mit anderer Geschwindigkeit ablaufen als bei den letzteren.

¹⁾ Sarin, Apparat zur Katalasebestimmung. Arbeiten aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratorium des Ackerbauministeriums, S. 11. Petersburg 1913 (russisch).

Tabelle II.
Katalase im Darmkanal der Biene.

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Konzentration und Zusammensetzung des Auszugs	Sauerstoff in ccm			
			Honigmagen	Magen	Dünndarm	Dickdarm
1	8. IV. 1917	60 Bienenmagen in 25 ccm Glyc.	0	6,5	0	2,0
2	23. VI.	30 " " 12,5 " "	0	1,5	0	0
3	16. XI.	30 " " 15 " " + 15 ccm Wasser	0	1,3	0	0
4	1. IV. 1918	30 " " 15 " " + 15 " "	0	11,5	0	3,5
5	1. IV.	30 " " 30 " Wasser	0	9,5	0	2,0
6	15. IV.	15 " " 7,5 " Glyc. + 7,5 " "	0	7,3	0	3,3
7	15. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	13,2	0	2,8
8 ¹⁾	22. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	5,3	0	0,3
9	24. IV.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	7,0	0	0
10	19. VI.	15 " " 7,5 " " + 7,5 " "	0	9,2	0	0
11	2. VII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	3,0	0	0
12	4. VII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	2,0	0	0
13	4. VII.	15 Drohnenmagen, 7,5 " " + 7,5 " "	0	2,5	0	0
14	7. VIII.	25 Bienenmagen " 25 " " + 25 " "	0	8,5	0	0
15	21. VIII.	25 " " 25 " " + 25 " "	0	4,0	0	0

Durch eine diesbezügliche Untersuchung könnte vielleicht aufgeklärt werden, warum es nicht möglich ist, südliche Bienen im Norden zu akklimatisieren. Wenn sie in den Norden übergeführt werden, so kommen sie in die ihnen ungewohnten Bedingungen der langen Winterruhe, und folglich häufen sich in ihrem Dickdarm große Kotmengen an. Es ist verständlich, daß ihr Organismus, der an solche Bedingungen nicht angepaßt ist, verschiedenen Erkrankungen ausgesetzt ist, unter denen verheerende Durchfälle wohl den ersten Platz einnehmen.

Um festzustellen, ob die Sekrete der verschiedenen Teile des Darmkanals bei einer gegenseitigen Mischung einander nicht stimulieren, bestimmten wir die Menge Katalase bei allen möglichen Kombinationen der Auszüge: in jedem einzelnen Falle wurden je 2 ccm der unten erwähnten Auszüge benutzt:

	Frühling 1. IV. 1918 ccm	Sommer 4. VII. 1918 ccm
A Honigmagen + Dünndarm + Dickdarm . . .	4,0	0
B " + "	0,0	0
C " + Dickdarm	4,0	0
D Dünndarm + "	3,9	0

Diese Versuche zeigen, daß im Frühling Katalase, außer vom Magen, nur noch vom Dickdarm ausgeschieden wird (Versuche A, C, D). Die übrigen zwei Abschnitte des Darmkanals (Honigmagen und Dünndarm)

¹⁾ Für den Versuch Nr. 8 sind solche Bienen genommen worden, die bereits ihren ersten Frühjahrsausflug gemacht hatten, wobei der Inhalt des Dickdarms entleert worden war.

scheiden weder einzeln, noch im Gemisch mit anderen (B) Katalase aus; im Sommer hingegen, bei normaler Nahrungsaufnahme der Bienen, wird das Ferment nur durch den Magen erzeugt. Um den Einfluß der Auszugsdauer der Extrakte auf die Aktivität der Katalase zu studieren, wurden besondere Versuche unternommen. In einer Portion wurden die einzelnen Teile des Darmkanals mit frisch ausgeglühtem Seesand unter Zugabe einiger Tropfen Glycerin sorgfältig verrieben; die erhaltene Emulsion wurde mit einem Gemisch gleicher Teile Wasser und Glycerin verdünnt und zehn Tropfen Toluol hinzugefügt. Zur Bereitung der zweiten Portion wurden dieselben Teile des Darmkanals benutzt, nur wurden die Stückchen nicht verrieben, sondern so, wie sie waren, in ein Glycerin-Wassergemisch getaucht.

In der Tabelle III sind die Zeitabschnitte der Katalaseeinwirkung, sowie die Resultate der Bestimmung angegeben.

Tabelle III.

Einfluß der Dauer der Extraktion aus dem Darmkanal auf die Aktivität der Katalase im Zusammenhang mit der Herstellungsweise des Auszugs.

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Konzentration und Zusammen- setzung des Auszugs	Der Teil des Darmkanals	Die Dauer der Extraktion aus den Teilen des Darmkanals in verriebenem sowie unverriebenem Zustande									
				1/2 Stunde	24 Stunden	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	7 Tage	12 Tage	14 Tage	
Sauerstoff in ccm													
16	18. VI. 1918	15 Bienen- därme in 30 ccm Gly- cerin + 30 ccm Wasser	Verriebene	Honig- magen	0	0	—	0	—	—	—	—	—
16 a			Unverriebene	Magen	0	0	—	0	—	—	—	—	—
17			Verriebene	Magen	9,2	9,2	—	6,0	—	—	3,0	—	1,0
17 a			Unverriebene	Magen	3,7	16,7	—	22,0	—	—	21,0	—	5,0
18			Verriebene	Dünn- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
18 a			Unverriebene	Dünn- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
19	4.VII. 1918	25 Bienen- därme in 50 ccm Glycerin + 50 ccm Wasser	Verriebene	Dick- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
19 a			Unverriebene	Dick- darm	0	0	—	0	—	—	—	—	—
20			Verriebene	Magen	4,5	3,8	3,0	2,4	2,5	2,5	—	—	2,2
20 a			Unverriebene	Magen	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	—	—	0,2
21			Verriebene	Magen	2,0	1,8	2,0	1,2	—	—	—	1,2	—
21 a			Unverriebene	Magen	1,0	1,3	2,2	2,0	—	—	—	0,5	—

Aus den Daten der Tabelle läßt sich folgendes ersehen:

Katalase wird, wie gewöhnlich, nur vom Bienenmagen produziert. Die Menge des Ferments ist äußerst verschieden, je nachdem der Auszug aus verriebenen oder nicht verriebenen Teilen hergestellt ist. Im ersten Auszuge (Nr. 17) ließ sich nach halbstündigem Stehen fast die dreifache Menge nachweisen als im zweiten (Nr. 17a).

Die Aktivität des Ferments in den nächstfolgenden Tagen war in beiden Fällen sehr verschieden. Im Auszuge aus den verriebenen Magen fiel die Aktivität beständig bis zum völligen Verschwinden, das nach 30 Tagen festgestellt werden konnte. Bei dem Parallelversuch mit nicht

verriebenen Magen dagegen nahm die Aktivität der Katalase mit der Auszugsdauer schnell zu. So war die Wirkung des Ferments schon nach 24 Stunden viermal stärker geworden, als sie am Anfang war, am 3. Tage fast um das Sechsfache, erst vom 7. Tage an fing die Aktivität an, äußerst schnell zu sinken.

Diese Verschiedenheit in der Aktivität erkläre ich durch die verschiedene Bereitungsweise der Auszüge. Beim sorgfältigen Verreiben des Magens werden seine Gewebezellen zerstört und es wird die maximale Katalasemenge frei, die mit der Dauer des Stehens inaktiv zu werden anfängt. Wenn dagegen die Stückchen des Magens nicht verrieben werden und folglich nur eine kleine Anzahl seiner Zellen zerstört wird, so kann nur eine kleine Fermentmenge in Lösung gehen, deren Aktivität zunimmt.

Das kann auf zweierlei Art erklärt werden: entweder fahren die unzerstörten Zellen des Magens fort, Katalase zu entwickeln, oder ihre Menge bleibt dieselbe und geht während des Stehens allmählich aus dem Gewebe in die Flüssigkeit über.

Die beiden nächsten Parallelversuche (Nr. 20, 20a und Nr. 21, 21a), die zur Bestätigung des eben Angeführten unternommen wurden, ergaben ein etwas anderes Bild. Bei den aus verriebenen Magen hergestellten Auszügen konnte die Tatsache der sofortigen Ausscheidung größerer Katalasemengen bestätigt werden, ebenso auch die allmähliche Abnahme der Aktivität. Doch konnte eine Zunahme der Fermentwirkung bei den Auszügen aus nicht verriebenen Magen nur in Nr. 21a nachgewiesen werden, wo am 2. Tage die Aktivität doppelt so groß geworden war. Dagegen konnte bei Versuch Nr. 20a keine Zunahme der Wirkung gefunden werden: 5 Tage stand die Aktivität auf derselben Höhe.

Die angeführten Versuche zeigen, daß die Wirkung der Katalase sehr mannigfaltig ist, was von einer ganzen Reihe von Bedingungen abhängt, unter denen die Individualität des Stoffwechsels der Biene wohl den ersten Platz einnimmt. Die Aufklärung dieser Bedingungen muß einer besonderen Arbeit vorbehalten bleiben.

Amylase.

Die Gegenwart von Amylase im Bienenorganismus wurde von *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾ und von *Petersen*²⁾ nachgewiesen.

Bei unseren Versuchen benutzten wir Auszüge, deren Bereitung auf S. 61 beschrieben wurde.

Zu 2 ccm dieser Auszüge kamen 0,1 ccm einer 0,5proz. Lösung löslicher Stärke, 8 ccm Wasser und zwei Tropfen Toluol, dann wurden die Probierröhrchen auf eine Stunde in ein Wasserbad von 45° C gestellt. Nach dieser Zeit wurden sie herausgenommen, abgekühlt und tropfenweise mit einer Jod-Jodkalilösung versetzt.

Alle Auszüge aus den Bienenmagen ergaben ein positives Resultat: nach dem Hinzufügen von Jodlösung färbten sich alle hellgelb; die Auszüge aus den drei anderen Teilen des Darmkanals, nämlich aus dem Honigmagen, Dünn- und Dickdarm enthielten dagegen keine Amylase: das Gemisch wurde beim Versetzen mit Jod blau.

Unsere Versuche ergeben also, daß Amylase nur im Magen der Biene zu finden ist, während die anderen Teile des Darmkanals dieses Ferment

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, l. c.

²⁾ *Petersen*, l. c.

nicht erzeugen. Dabei geht die Spaltung der Stärke nicht nur bis zur Dextrinbildung, wie *Petersen* nachweisen konnte, sondern bis zur Bildung von Maltose und Dextrose. Dank dem Amylasegehalt des Magens kann daher die Biene auch stärkehaltige Nahrung assimilieren.

Daß *Erlenmeyer* und *Planta* Amylase in allen drei Auszügen (aus Kopf, Brust und Hinterleib) gefunden haben, kann im Zusammenhang mit unseren Resultaten so erklärt werden: die im Hinterleib nachgewiesene Amylase stammt sicher aus dem Magen der Biene; in Auszügen aus Kopf und Brust dagegen wird sie durch die Speicheldrüsen erzeugt, da der die beiden genannten Teile durchziehende Vorderdarm (Speiseleiter) keine Amylase produziert.

Inulinase.

Über das Vorkommen von Inulinase im Bienenorganismus finden sich in der Literatur keine Angaben.

Bei unseren Versuchen versetzten wir 10 ccm einer 1proz. Inulinlösung mit 3 ccm der zu prüfenden Extrakte. Nachdem sich das Gemisch 48 bzw. 72 Stunden im Thermostaten (bei 36 bis 40° C) befunden hatte, konnte in keinem einzigen Falle Reduktion von *Fehlingscher* Lösung bemerkt werden.

Man kann daher annehmen, daß vom Darmkanal der Biene Inulinase nicht erzeugt wird.

Lactase.

In der Literatur liegen keine Mitteilungen darüber vor, ob der Darmkanal der Biene Lactase ausscheidet. Zur Bestimmung dieses Ferments fügten wir zu je 50 ccm einer 5proz. Milchzuckerlösung je 5 ccm von unseren Extrakten. Das Gemisch wurde 48 Stunden auf 37 bis 40° C gehalten, auf 20° C abgekühlt, ein Tropfen Ammoniak zugesetzt (um Multitrotation zu verhindern) und die Drehung der Polarisationssebene ermittelt. Bei keinem einzigen Versuch konnte eine Differenz der Drehungswinkel zwischen den Versuchs- und Kontrollösungen beobachtet werden.

Aus diesen Versuchen ist daher der Schluß zu ziehen, daß vom Darmkanal der Biene keine Lactase erzeugt wird.

Invertase.

Invertase wurde ebenfalls nur im Magen der Biene nachgewiesen. Näheres über dieses Ferment werde ich in einer anderen Arbeit mitteilen.

Lipase.

Als Fettnahrung kommt für die Biene hauptsächlich das Bienenbrot in Betracht, das nach unseren Untersuchungen bis 6 % Fettstoffe enthält. Die Frage, ob die Fettstoffe des Bienenbrots vom Bienenorganismus assimiliert werden, konnte bis jetzt nicht als gelöst angesehen werden, da in der Literatur keinerlei Angaben über das Vorkommen von Lipase im Bienenkörper vorliegen. *Petersen*¹⁾, dem es nicht gelang, in den Epithelzellen des Verdauungsmagens der Biene durch Osmiumsäure und den Farbstoff Sudan III Fette nachzuweisen, sagt: „Als sicher darf ich wohl hinstellen, daß das meiste Fett, auch der normalen Nahrung, den Darm passiert, ohne gespalten oder resorbiert zu werden.“

¹⁾ *Petersen*, l. c.

Um Lipase festzustellen, benutzten wir 1proz. Lösung von Monobutyryn und Emulsionen aus Provenceröl. Zu 10 ccm der Monobutyryn-lösung oder der Emulsion wurden je 2 ccm der auf Lipase zu prüfenden Auszüge und drei Tropfen Toluol zugesetzt. Die Röhren mit den Flüssigkeiten kamen auf 48 Stunden in einen Thermostaten von 35 bis 38° C, worauf die Proben mit n/10 Natronlauge bei Gegenwart von Phenolphthalein als Indikator titriert wurden; die Ölemulsionen erhielten vor dem Titrieren noch 10 ccm eines vorher neutralisierten Gemisches aus Äther und Alkohol.

Alle ausgeführten Versuche ergaben im allgemeinen gleiche Resultate. Nur die Röhren, die Auszüge aus dem Magen enthielten, wiesen eine Zunahme der Azidität auf, sowohl bei der Monobutyrynlösung als auch bei der Emulsion; diese Zunahme schwankte bei unseren Versuchen zwischen 0,3 bis 0,6 ccm n/10 NaOH, wobei das Ferment auf Monobutyryn eine stärkere Wirkung ausübte als auf Olivenöl.

Auszüge aus anderen Teilen des Darmkanals hatten dagegen auf die Azidität der Probelösungen keinen merkbaren Einfluß.

Aus diesen Versuchen läßt sich daher der Schluß ziehen, daß der Bienen- und Drohnenmagen neben anderen Fermenten auch Lipase ausscheidet; die Biene kann also auch Fette assimilieren.

Pepsin.

Um dieses Ferment festzustellen, benutzten wir folgende Methoden:

1. Eine sterile 10proz. Gelatinelösung wurde mit Salzsäure angesäuert und in dünne Probierröhrchen verteilt (2 ccm in jedes). In jedes Röhren kamen 2 ccm der zu prüfenden Auszüge und drei Tropfen Toluol. Das Gemisch wurde in einen Thermostaten von 35 bis 38° C gestellt und alle 24 Stunden beobachtet, wie weit die Gelatine bei Abkühlung erstarrte.

2. Ein Stück Blutfibrin wurde in ein Gemisch aus 8 ccm sterilen Wassers (mit Salzsäure angesäuert), 2 ccm der auf Pepsin zu untersuchenden Auszüge und drei Tropfen Toluol getaucht und kam dann in einen Thermostaten von 35 bis 38° C.

3. Es wurde eine 1proz. Caseinlösung bereitet, die im Liter 16 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,124 enthielt. 10 ccm dieser Caseinlösung wurden mit 2 ccm der zu prüfenden Extrakte versetzt und auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38 bis 40° C gestellt. Nach dieser Zeit wurde tropfenweise eine konzentrierte Natriumacetatlösung hinzugefügt.

Diese drei Methoden gaben in allen Fällen übereinstimmende Resultate: Pepsin wurde nur im Bienen- und Drohnenmagen festgestellt; die übrigen Teile des Darmkanals enthielten es nicht.

1. Gelatine, die mit Extrakten aus Bienen-Drohnenmagen versetzt war, verlor die Fähigkeit zu erstarren nach 1 bis 3 Tagen, während Extrakte aus den übrigen Teilen des Darmkanals auch nach 20 Tagen keinen bemerkbaren Einfluß auf den Erstarrungsgrad der Gelatine ausübten¹⁾.

2. In den Röhren, in denen sich Auszüge aus dem Magen befanden, löste sich Fibrin innerhalb 1 bis 3 Tagen; in den übrigen Röhren wurde

¹⁾ Um festzustellen, ob das verflüssigte Gelatinegemisch und die Fibrinlösung steril geblieben waren, wurden Impfungen auf schräg erstarrtem Agar gemacht: nach 36stündigem Verweilen bei 37° C wurde keine Entwicklung von Bakterien beobachtet.

es auch nach 20 Tagen nicht verändert. Nach dieser Zeit wurde sowohl in 1. als auch in 2. der Versuch abgebrochen.

3. Auch die Caseinprobe gab eine positive Reaktion nur bei Extrakten aus dem Magen.

Aus dem oben Angeführten kann man daher schließen, daß der Bienen- und Drohnenmagen ein peptisches Ferment enthält, das in saurer Lösung seine Wirkung äußert, während der Honigmagen, der Dünndarm, sowie auch der Dickdarm mit den Rektaldrüsen kein derartiges Ferment ausscheiden.

Trypsin.

Um Trypsin festzustellen, wurden folgende zwei Lösungen benutzt:

1. Eine alkalische 10proz. Gelatinelösung, wie bei der Pepsinbestimmung; die Verflüssigung erfolgte nach 1 bis 3 Tagen, und zwar nur bei den Extrakten aus dem Magen.

2. Eine alkalische Caseinlösung: 10 ccm einer 1proz. Lösung von Casein, die auf 200 ccm zehn Tropfen einer 10proz. Sodalösung enthielt, wurden mit 2 ccm der zu prüfenden Auszüge versetzt; das Gemisch kam auf eine Stunde in ein Wasserbad von 38 bis 40° C, worauf tropfenweise 0,5proz. Essigsäurelösung zugefügt wurde: falls das Casein unverändert geblieben war, entstand eine Trübung.

Die beiden beschriebenen Methoden ergaben in allen Fällen gleiche Resultate, wobei Trypsin nur im Magen der Biene und Drohne gefunden wurde, während andere Teile des Darmkanals dieses Ferment nicht enthielten.

Chymosin.

In der Literatur findet man nichts über das Vorkommen von Chymosin im Bienenorganismus.

Zur Bestimmung dieses Ferments wurde ein Gemisch aus 10 ccm Milch + 9 ccm Wasser + 1 ccm 10proz. Chlorcalciumlösung hergestellt. 10 ccm dieses Gemisches wurden mit 1 ccm der zu prüfenden Auszüge versetzt und darauf in ein Wasserbad von 40° C gestellt. Extrakte aus dem Magen koagulierte Milch, und zwar stets, wobei sich bei den von uns ausgeführten Versuchen das Koagulum nicht früher als nach 2, und nicht später als nach 15 Minuten bildete. Dagegen konnte bei Auszügen aus anderen Teilen des Darmkanals keine Koagulation bemerkt werden, selbst nicht nach dreistündigem Stehen; nach dieser Zeit wurde der Versuch abgebrochen.

Die Versuche zeigen also, daß sich im Magen der Biene und Drohne ein Labferment von bedeutender Aktivität befindet.

Emulsin.

Es wurden von Amygdalin, Salicin und Arbutin 1proz. Lösungen hergestellt.

25 ccm jeder Lösung wurden mit 5 ccm des entsprechenden Extrakts und fünf Tropfen Toluol versetzt und kamen dann in einen Thermostaten von 36 bis 40° C. Nach 24 bis 48 bis 72 Stunden konnte keine Glykosid-

spaltung beobachtet werden: die Flüssigkeiten reduzierten nicht *Fehlingsche* Lösung, und beim Amygdalin konnte auch nicht der charakteristische Blausäuregeruch wahrgenommen werden.

Es erweist sich, daß unter unseren Versuchsbedingungen im Darmkanal der Biene keine Fermente gefunden wurden, die Amygdalin, Salicin oder Arbutin spalteten.

Schlußbetrachtung.

Betrachten wir noch zum Schluß die Verteilung der oben angeführten Fermente auf die Abschnitte des Darmkanals der Biene (Tab. IV). Wenn man die verschiedenen Lebens- und Nahrungsbedingungen der Arbeitsbienen und Drohnen in Betracht zieht, so könnte man meinen, daß auch die von ihrem Darm erzeugten Fermente verschieden seien. Parallelversuche ergaben jedoch unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen keinerlei Unterschiede in den Fermentausscheidungen der Arbeitsbienen und Drohnen.

Sämtliche gefundenen Fermente wurden nur im Magen der Biene festgestellt. Die Tatsache, daß nur der Mitteldarm der Biene Fermente ausscheidet, ist völlig analog der Erscheinung, die man auch bei anderen Insekten beobachtet, da sich bei allen Arthropoden die hauptsächlichsten Verdauungsprozesse im Mitteldarm und im Hepatopankreas abspielen.

Tabelle IV.

Gesamttabelle der in verschiedenen Teilen des Darmkanals der Arbeitsbiene und der Drohne gefundenen Fermente.

	Honig- magen	Magen	Dünn- darm	Dick- darm	Bemerkungen
Katalase	—	+	—	○	○ Man findet sie im Dickdarme nur während der zweiten Hälfte des Winters.
Amylase	—	+	—	—	
Inulinase	—	—	—	—	
Lactase	—	—	—	—	
Invertase	—	+	—	—	
Lipase	—	+	—	—	
Pepsin	—	+	—	—	
Trypsin	—	+	—	—	
Chymosin	—	+	—	—	
Emulsin	—	—	—	—	

+ bedeutet beständige Anwesenheit des Ferments.

○ bedeutet beständige Anwesenheit des Ferments nur in bestimmten Zeiten.

— bedeutet Abwesenheit des Ferments.

Bei der Betrachtung der obenstehenden Tabelle IV fällt es auf, daß Katalase in den Extrakten aus dem Dickdarm nicht immer gefunden wird. Das scheint eine gewisse Dissonanz in die Resultate der Arbeit zu bringen und widerspricht allgemein anerkannten Tatsachen. Doch

beim näheren Hinsehen läßt sich eine bestimmte und überzeugende Erklärung dafür finden. Die Sache ist die, daß im Auszug aus dem rectum Katalase nicht zufällig gefunden wurde, sondern in einer bestimmten Jahreszeit, nämlich im Frühling, bevor die Bienenstöcke ins Freie gestellt wurden. In dieser Zeit findet sich im rectum sehr viel Katalase; nach den ersten Ausflügen der Bienen nimmt jedoch die Fermentmenge plötzlich ab, und schon nach 2 Tagen kann im Dickdarm der Biene keine Katalase mehr nachgewiesen werden. Dies ist naturgemäß mit der Arbeit des Darmkanals während des Winters verknüpft. Die Biene nimmt die ganze Zeit Nahrung zu sich, doch entleert sie sich nicht während ihrer Winterruhe. Die Folge davon ist, daß sich der Kot im rectum ansammelt und es bis zu außerordentlichen Dimensionen vergrößert. Der Magen wird kürzer und dicker, besonders schwillt aber der Dickdarm an, der sich in eine riesige, ovale Blase verwandelt, in der sich (wie auch im Dünndarm) eine unermessliche Menge Bakterien ansammelt. Es ist unzweifelhaft, daß sich die Kotansammlung und ihr langes Verweilen im rectum auf die eine oder andere Weise im Stoffwechsel der Biene spiegeln muß. Das äußert sich darin, daß der Dickdarm während der Zeit, wo die Biene sich nicht entleeren kann, Katalase ausscheidet. Die intensive Erzeugung dieses Ferments steht im Zusammenhang damit, daß der Organismus energischere Oxydationsprozesse benötigt, während im Sommer eine solche Notwendigkeit nicht vorliegt, da sich der Darmkanal dann seiner Exkremente normal entledigen kann.

Wir können also logisch erklären, warum Katalase im rectum vorkommt. Es bleibt noch übrig nachzuweisen, an welcher Stelle dieses Ferment gebildet wird. Es liegen zwei Möglichkeiten vor: a) entweder wird die Katalase durch die Wandungen des Dickdarms abgeschieden (lokaler Ursprung des Ferments) oder b) die Katalase entstammt den höher gelegenen Teilen des Darmkanals, nämlich dem Magen, von wo er mit der Nahrung ins rectum gelangt.

Betrachten wir zunächst die zweite Möglichkeit. Bei der Extraktbereitung aus dem rectum wurde der Dickdarm der Biene zerschnitten, wobei die Kotmassen von selbst herausfielen; darauf wurde die Wandung des Darmes mit frischer physiologischer Kochsalzlösung durchgespült. Nur dann, wenn das rectum auf diese Weise von seinem Inhalt gereinigt war, wurde es mit Sand und Glycerin zerrieben. Die beschriebene Vorsichtsmaßregel verbürgt in gewissem Grade die Reinheit des herzustellenden Auszugs und gibt uns folglich das Recht, der Dickdarmwandung selbst die Fähigkeit zuzuschreiben, Katalase zu erzeugen.

Indirekt wird diese Schlußfolgerung auch durch einen anderen Umstand bestätigt. Wenn wir die Annahme machen, daß die Katalase zusammen mit der Nahrung aus dem Magen ins rectum gelangt, so

mußte dieses Ferment nicht nur während des ganzen Jahres im Dickdarm zu finden sein, sondern auch im Dünndarm, der den Magen mit dem rectum verbindet. Doch wurde nicht ein einziges Mal Katalase im Dünndarm festgestellt, trotzdem die entsprechenden Auszüge weniger sorgfältig hergestellt wurden. Dieser Teil des Darmkanals ist nämlich sehr dünn, daher konnten die in ihm befindlichen Kotmassen in der Regel nicht entfernt werden, und die Extrakte wurden aus Stücken des Dünndarms mit seinem gesamten Inhalt an Exkrementen und Bakterien hergestellt. Dieser Umstand spricht auch gegen die Annahme, daß die Katalase von den sich im Dickdarm ansammelnden Bakterien erzeugt wird: denn in diesem Falle müßte sich dieses Ferment im rectum nicht nur im Frühling, sondern auch während der Winterruhe nachweisen lassen. Wenn nun Auszüge aus dem höher gelegenen Teil des Darmkanals und seinem Inhalt keine Katalase aufweisen, dagegen der Extrakt aus den gesäuberten Wandungen des Dickdarms sie enthält, so muß man folgern, daß dieses Ferment vom Dickdarm der Biene erzeugt wird, nicht aber aus anderen Teilen des Darmkanals dort hingelangt. Während das rectum der Biene wenigstens periodisch Fermente (Katalase) ausscheidet, ist der Honigmagen dazu gänzlich unfähig. Denn in den Extrakten aus dem Honigmagen konnten nie irgendwelche Fermente festgestellt werden. Dieser Umstand gibt uns die Möglichkeit, der Lösung der Frage nach der Honigbildung näherzukommen.

Die Biene sammelt den Nektar in den Honigmagen, von wo sie ihn in die Waben ablegt. Ist nun der Honigmagen ein passives Reservoir zur zeitweiligen Aufbewahrung des Nektars, oder gehen in ihm außer der Spaltung des Rohrzuckers noch andere biochemische Prozesse vor sich? Was geschieht mit dem in die Waben abgelegten Nektar während der Reifung des Honigs?

Um diese Fragen zu klären, stellte ich¹⁾ 1916 besondere Versuche an, bei denen die Bienen hauptsächlich mit Zuckersirup gefüttert wurden; dieser Sirup passierte dann noch zweimal den Bienenorganismus. Es wurde nämlich folgendermaßen vorgegangen: beim ersten Versuch erhielten die Bienen 25 Pfund Sirup; nach 2 Tagen wurde der in die Waben abgelegte Zuckerhonig herausgenommen und von neuem an die Bienen verfüttert; der zum zweitenmal abgelegte Honig blieb im Stock bis zum Augenblick des Verschließens der Waben und wurde dann den Bienen wiederum vorgesetzt, der zum drittenmal abgelegte Honig wurde gleich dem ursprünglichen Zuckersirup und den beiden ersten Honigen der chemischen Analyse unterworfen.

Bei der Reifung des Honigs wird der Rohrzucker invertiert; daneben bildet sich eine gewisse Menge dextrinartiger Stoffe, die *Fehlingsche*

¹⁾ E. Sarin, diese Zeitschr. 120, 250, 1921.

Lösung nicht reduzieren. Also ist im Naturhonig außer dem Nichtzucker pflanzlichen Ursprungs auch solcher enthalten, der vom Organismus der Biene erzeugt wird und als Produkt der reversiblen Tätigkeit der Fermente anzusehen ist.

Der den Bienen verfütterte Zuckersirup war vollständig fermentfrei; in den aus ihm gebildeten Zuckerhonigen wurden aber Invertase und Diastase gefunden, die beiden Fermente können also nur aus dem Körper der Biene stammen. Katalase ist in einem solchen Kunsthonig nicht vorhanden, während Naturhonige sie stets enthalten. Wahrscheinlich gerät dieses Ferment zusammen mit dem Nektar in den Honig.

Durch diese Versuche wird die Frage nach der Art der in den untersuchten Honigen vorkommenden Fermente geklärt; einige von ihnen (Katalase) sind pflanzlichen, andere (Invertase und Amylase) sowohl tierischen wie pflanzlichen Ursprungs.

Wenn nun die im Honig vorkommenden Invertase und Diastase aus der Biene stammen, so muß man sich noch die Frage vorlegen, an welcher Stelle des Organismus diese Fermente erzeugt werden. Unsere Versuche geben einiges Material zur Klärung dieser Frage. Die einfachste Annahme wäre die, daß die genannten Fermente von den Wandungen desjenigen Reservoirs ausgeschieden würden, in das die Biene den Nektar einsammelt; doch dieses ist nicht so, denn die Wandungen des Honigmagens haben keinerlei sekretierende Eigenschaften: in entsprechenden Auszügen konnte in keinem einzigen Falle irgend ein Ferment nachgewiesen werden. Augenscheinlich gelangen sie in den Honigmagen aus anderen Teilen des Verdauungsapparats; diese könnten entweder der Magen sein, in dem tatsächlich Fermente ausgeschieden werden, oder auch die Speicheldrüsen. Wenn man annimmt, daß die Honigfermente aus dem Magen der Biene stammen, so müßte man die Möglichkeit zugeben, daß sie sich entgegengesetzt der normalen Richtung der Nahrung bewegten, nämlich aus dem Magen in den Honigmagen. Die anatomischen Befunde lassen jedoch diese Möglichkeit nicht zu, da sich zwischen Honigmagen und Magen eine Klappe befindet, die es nicht gestattet, daß der gewöhnliche Mageninhalt, also auch die Fermente, in den Honigmagen gelangen. Bei der Annahme eines solchen „Aufstoßens“ der Fermente würden außerdem nicht nur Invertase und Diastase in den Honigmagen gelangen, sondern auch Katalase, die ja immer von der Magenwandung ausgeschieden wird. In diesem Falle würde sie auch in den oben beschriebenen Kunsthonigen (aus Zuckersirup) festzustellen sein. Da dieses nicht gelang, kann man den pflanzlichen Ursprung der Katalase als bewiesen betrachten, da es doch unwahrscheinlich wäre, anzunehmen, daß ein selektives „Aufstoßen“ der Magenfermente stattfindet.

Auch in bezug auf die Fermente des Honigs kann man eine Annahme machen, die analog der vorigen ist. Die Fermente werden von den Speicheldrüsen der Biene erzeugt, mit dem Nektar in den Honigmagen hinuntergeschluckt und gelangen von dort beim Ablegen des Honigs in die Waben. Diese Erklärung scheint ja wohl die annehmbarste zu sein, doch steht sie nicht auf ganz sicherer Grundlage, da die Bedeutung der Speicheldrüsen für die Verdauung nicht bekannt ist. Bei anderen Insekten hat man im Speichel sehr energische Verdauungsfermente gefunden; natürlich wird es bei der Biene auch so sein: zu welchem Zweck hätte sie sonst das System der Speicheldrüsen. Auf Grund der Resultate dieser Arbeit kann man es auch versuchen, der teilweisen Lösung der Frage nach der Assimilation dieser oder jener Nährstoffe näherzutreten. *Petersen*¹⁾ fütterte Bienen mit zuckerhaltiger Ölemulsion und kam zum Schluß, daß die größte Menge des Fettes auch bei normaler Ernährung den Magen passiert, ohne assimiliert oder gespalten zu werden.

Diese Meinung *Petersens* wird durch die Tatsache widerlegt, daß im Extrakt aus dem Bienenmagen beständig Lipase gefunden wurde. Ist nun dieses Ferment im Magen vorhanden, so ist es doch klar, daß es zu einem seiner Natur entsprechenden Zweck, d. h. zur Fettspaltung, ausgeschieden wird.

Die nächste Aufgabe der weiteren Erforschung der Verdauungsprozesse bei den Bienen würde sein, umfangreiche Versuche anzustellen, bei denen die Versuchsvölker ausschließlich mit je einem bestimmten Nährstoff gefüttert werden müßten, dann könnte man die Art und die Wirkung der unter diesen künstlich geschaffenen Bedingungen erzeugten Fermente feststellen. Die Resultate solcher Untersuchungen hätten nicht nur theoretisches, sondern auch praktisches Interesse. In Jahren schlechter Honigernte stehen die Imker vor der schwierigen Aufgabe, die Völker im Winter mit Surrogaten zu füttern; das Resultat einer solchen Fütterung sind oft verderbliche Erkrankungen der Bienen. Wenn die Bedingungen der Tätigkeit des Darmkanals der Biene und ihres Stoffwechsels in den verschiedenen Jahreszeiten bekannt wären, so könnte man die Frage der künstlichen Fütterung rationell lösen und brauchte nicht tastend und oft rein empirisch vorzugehen.

Ich²⁾ habe schon Versuche unternommen, um auf rein chemischem Wege eine in praktischer Beziehung wichtige Frage zu klären: ob es einen Sinn hat, das Winterfutter der Bienen anzusäuern, wie es oft von vielen praktischen Imkern gehandhabt wird. Es erwies sich, daß von einer günstigen Wirkung der Säure auf die Inversion des Rohrzuckers

¹⁾ *Petersen*, l. c., S. 49.

²⁾ *E. Sarin*, diese Zeitschr. 120, 259, 1921.

und auf die Reifung des Honigs keine Rede sein kann. Im Gegenteil, falls zum Futter z. B. 0,3 % Citronensäure zugesetzt wurde, wurde nicht nur der Prozeß der Zuckerinversion gehemmt, sondern auch alle anderen Prozesse, die sowohl im Honigmagen der Arbeitsbiene, wie auch im Stock während der Reifung des Honigs vor sich gehen. Die erhaltenen Resultate widersprechen also direkt der unter den Imkern vorherrschenden Ansicht, daß es notwendig wäre, dem Futter einen gewissen Säurezusatz zu geben.

Wie bei jeder Arbeit, die die Lebensvorgänge eines Organismus zu erforschen sucht, verknüpft sich auch hier eine Frage mit der anderen. Im Zusammenhang mit dieser Abhandlung tauchen weitere Fragen auf, mit deren Lösung wir bei der ersten Möglichkeit uns zu beschäftigen gedenken. Arbeiten in dieser Richtung erscheinen uns besonders dankbar, da in denselben große wissenschaftliche Interessen mit den Forderungen des praktischen Lebens verknüpft sind.

Weitere Studien über Invertase des Darmkanals der Honigbiene.

Von

E. Sarin.

(Aus dem Laboratorium für Chemie der Nahrungs- und Genußmittel der Universität Riga.)

(Eingegangen am 16. Oktober 1922.)

Das Vorkommen von Invertase im Bienenorganismus stellten zuerst *Erlenmeyer* und *Planta*¹⁾ fest, die Glycerinauszüge aus Kopf, Brust und Hinterleib der Bienen benutzten.

Die Extrakte aus Kopf und Hinterleib erwiesen sich aktiver als die aus der Brust. *Axenfeld*²⁾ zergliederte den Darmkanal der Bienen in drei Teile: Honigmagen, Magen und Hinterdarm. Er ließ die genannten Teile auf Saccharose einwirken und fand, daß die größte Aktivität vom Magen geäußert wurde, während der Honigmagen und der Hinterdarm nur schwach invertierten. *Axenfeld* nimmt daher an, daß Invertase nur vom Magen ausgeschieden wird, aus dem ein kleiner Teil des Ferments auf mechanischem Wege in den Hinterdarm gelangt.

Bei unseren Versuchen gingen wir folgendermaßen vor:

Zu neutralen 5- und 10proz. Rohrzuckerlösungen fügten wir die zu untersuchenden Auszüge³⁾ aus dem Darmkanal der Bienen und Drohnen in Mengen, die in der Tabelle I angegeben sind. Die Flüssigkeit erhielt einen Zusatz von 1 ccm Toluol (als Antiseptikum) und kam auf 24 und 48 Stunden in einen Thermostaten von 36 bis 40° C. Nachdem das Gemisch auf Zimmertemperatur abgekühlt und ein Tropfen Ammoniak zur Vermeidung der Birotation hinzugefügt war, wurde im Halbschattenapparat von *Schmidt-Haensch* (Rohrlänge 200 mm) die Drehung der Polarisationsebene bestimmt. Zur Kontrolle wurde jedesmal 5- oder 10proz. Zuckerlösung auf die Konzentration des zu prüfenden Gemisches gebracht, indem die entsprechende Menge Glycerin, Wasser oder eines Gemisches dieser Flüssigkeiten der Probe hinzugefügt wurde. Ebenso wurde als Antiseptikum 1 ccm Toluol zugegeben. Die Kontrollflüssigkeiten blieben ebensolange im Thermostaten und wurden unter denselben Bedingungen untersucht wie die Versuchsgemische.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind in folgender Tabelle I dargestellt:

¹⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, Chem. Zentralbl. 1874, S. 790.

²⁾ *Axenfeld*, Zentralbl. f. Physiol. 17, 268, 1903.

³⁾ Über die Bereitungsweise der Auszüge s. die Arbeit: „Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene“. Diese Zeitschr. 185, 59, 1923.

Tabelle I. Die Invertase im Darmkanal

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Konzentration und Methode der Bereitung des Auszugs				
1	24. X. 1916	90 Bienenmagen	in 30 ccm	Glycerin		
2	8. IV. 1917	60 "	" 25 "	"		
3	23. VI.	30 "	" 12,5 "	"		
4	23. VI.	60 "	" 25 "	Wasser		
5	21. VII.	50 Drohnenmagen	" 25 "	Glycerin		
6	22. IX.	40 Bienenmagen	" 25 "	"		
7	16. XI.	30 "	" 15 "	"	+ 15 ccm	Wasser
8	1. IV. 1918	30 "	" 15 "	"	+ 15 "	"
9	1. IV.	30 "	" 30 "	Wasser		
10	15. IV.	15 "	" 7,5 "	Glycerin	+ 7,5 ccm	Wasser
11	16. IV.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
12	22. IV.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
13	24. IV.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
14	24. IV.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
15	18. VI.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
16	18. VI.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
17	18. VI.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
18	18. VI.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
19	2. VII.	25 "	" 25 "	"	+ 25 "	"
20	2. VII.	25 "	" 25 "	"	+ 25 "	"
21	2. VII.	25 "	" 25 "	"	+ 25 "	"
22	4. VII.	15 Drohnenmagen	" 7,5 "	"	+ 7,5 "	"
23	7. VIII.	15 Bienenmagen	" 15 "	Wasser		
24	7. VIII.	15 "	" 7,5 "	"	+ 7,5 ccm	Glycerin
25	7. VIII.	15 "	" 15 "	Glycerin		

Wenn wir die Daten der Tabelle I betrachten, so sehen wir, daß die beiden ersten Versuche, was Invertase anbetrifft, sich scharf von allen übrigen unterscheiden, trotz der gleichen Methodik der Extraktbereitung und der Ausführung der Analyse.

Während bei allen Versuchen, außer den ersten beiden, die Auszüge aus dem Magen eine beträchtliche Verminderung der Rechtsdrehung hervorbringen, ist bei Nr. 1 und 2 die Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollösung in dieser Beziehung so gering (0,07° und 0,03°), daß sie innerhalb der Analysenfehler fällt, und man auf Grund dieses geringen Unterschiedes keine bestimmten Folgerungen ziehen kann. Doch deutet die hohe Aktivität der Invertase, die bei den übrigen Versuchen festgestellt wurde, darauf hin, daß in den beiden genannten Proben dieses Ferment überhaupt nicht enthalten war. Es ist charakteristisch, daß in betreff anderer Fermente (Amylase, Inulinase, Lactase, Lipase,

Arbeitsbiene und der Drohne.

%	Die Menge der Zuckerlösung	Die Menge des Fermentauszugs	Die Dauer der Einwirkung d. Ferments	Polarisation										
				Kontrolllösung	Gemisch der Zuckerlösung mit dem Auszuge aus					Honig-magen, Dünndarm und Dickdarm				
					Honig-magen	Magen	Dünndarm	Dickdarm						
ccm	ccm	Std.	Drehungswinkel											
10	100	2	48	+	13,25	+	13,22	+	13,18	+	13,23	+	13,24	—
5	100	2	48	+	6,13	+	6,13	+	6,10	+	6,13	+	6,14	—
5	100	5	24	+	6,25	+	6,23	+	2,88	+	6,26	+	6,23	—
5	100	5	24	+	6,28	+	6,24	+	1,30	+	6,27	+	6,28	—
5	100	5	24	+	6,08	+	6 08	+	5,78	+	6,06	+	6,06	—
10	100	6	48	+	11,45	—	—	+	8,90	—	—	—	—	+ 11,28
5	50	5	48	+	5,65	—	—	+	2,12	—	—	—	—	+ 5,25
5	50	5	48	+	6,12	—	—	+	2,30	—	—	—	—	+ 5,15
5	50	5	48	+	6,00	—	—	—	0,82	—	—	—	—	—
5	50	5	48	+	6,00	+	5,89	+	0,10	+	5,84	+	5,90	—
5	50	5	24	+	6,13	—	—	+	0,66	—	—	—	—	—
5	50	5	24	+	6,13	+	6,12	+	2,55	+	6,13	+	6,12	—
5	50	3	24	+	6,13	—	—	+	2,30	—	—	—	—	—
5	100	2	24	+	6,32	—	—	+	3,55	—	—	—	—	—
5	50	5	24	+	5,87	+	5,87	+	2,67	+	5,88	+	5,89	—
5	50	5	48	+	5,88	—	—	+	2,69	—	—	—	—	—
5	50	1	24	+	6,13	—	—	+	4,65	—	—	—	—	—
5	50	1	48	+	6,15	—	—	+	4,60	—	—	—	—	—
5	50	6	24	+	5,90	—	—	+	2,18	—	—	—	—	+ 5,62
5	50	4	24	+	6,08	—	—	+	2,39	—	—	—	—	—
5	50	2	24	+	6,35	—	—	+	3,52	—	—	—	—	—
5	50	5	24	+	6,17	—	—	+	2,68	—	—	—	—	—
5	50	5	24	+	5,94	—	—	+	3,08	—	—	—	—	+ 5,71
5	50	5	24	+	5,92	—	—	+	2,50	—	—	—	—	—
5	50	5	24	+	5,98	—	—	+	3,94	—	—	—	—	—

Pepsin, Trypsin und Chymosin) zwischen den beiden ersten und den übrigen Versuchen kein nennenswerter Unterschied war.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurden die beiden ersten Versuche im Spätherbst und im April unternommen, als sich die Bienen noch in der Winterruhe befanden und sich von Honig nährten, der bekanntlich nur aus Invertzucker besteht und sehr wenig Saccharose enthält. Die Bedeutung der Invertase besteht aber, sowohl im Tier wie auch im Pflanzenreich, darin, daß sie gerade Saccharose in Invertzucker verwandelt, eine Zuckerart, die vom Protoplasma direkt assimiliert werden kann. Da nun die Zellen hauptsächlich dann Fermente erzeugen, wenn der Organismus ihrer bedarf, so erklärten wir das Fehlen der Invertase in den beiden erwähnten Versuchen vorläufig damit, daß die Bienen, die sich während des Winters von Invertzucker nähren, keines Saccharose spaltenden Ferments bedürfen und es daher auch nicht ausscheiden.

Es kommt gar nicht selten vor, daß ein und derselbe Organismus je nach den Bedingungen das eine oder andere Ferment bildet; bisweilen ist ein für das bestimmte Ferment spezifischer Stoff die genügende Ursache seiner Entstehung.

So z. B. gibt *Oppenheimer*¹⁾ an, daß einige Schimmelpilze gar keine Fermente ausscheiden, wenn sie auf Nährböden kultiviert werden, die für sie direkt assimilierbare Stoffe enthalten. Falls man jedoch zum Nährboden Eiweißstoffe hinzufügt, so bilden dieselben Schimmelpilze proteolytische Fermente beim Versetzen mit Stärkeamylase usw. *Brown* und *Moris*²⁾ zeigten, daß der Gerstenkeim keine Amylase produziert, falls den Körnern bei der Keimung assimilierbarer Zucker zur Verfügung steht.

Es ist daher möglich, daß auch der Bienenorganismus die Eigenschaft besitzt, unter geeigneten Bedingungen Invertase nicht zu erzeugen. Jedenfalls ergibt die Tabelle, daß Auszüge derselben Konzentration verschiedene Aktivität zeigen. Um die vorliegende Frage zu klären, beabsichtigen wir, besondere Versuche anzustellen.

Des weiteren läßt sich aus der Tabelle ersehen, daß nur die Auszüge aus dem Magen befähigt sind, die Drehung der Zuckerlösung in bedeutendem Maße zu ändern, während die Extrakte aus dem Honigmagen, Dünn- oder Dickdarm entweder überhaupt keine Wirkung oder nur eine ganz geringe ausüben. Anscheinend bilden die letztgenannten Abschnitte des Darmkanals keine Invertase, und falls in ihnen eine geringe Menge des Ferments gefunden wird, so entstammt es dem Magen, aus dem es mit der Nahrung übergeführt wird.

Bei den Versuchen Nr. 6, 7, 8, 19 und 22 wurde die Invertase in Extrakten bestimmt, die aus Honigmagen, Dünn- und Dickdarm zusammen bereitet worden waren, wobei eine geringfügige Änderung des Drehwinkels der Polarisationssebene beobachtet wurde.

Folglich kommen wir, was den Ort der Invertasebildung anbetrifft, zu demselben Schluß, wie *Axenfeld*³⁾, nämlich, daß es der Bienenmagen ist, der das Ferment erzeugt. *Erlenmeyers* und *Plantas*⁴⁾ Resultate, nach denen die Auszüge aus Kopf und Hinterleib der Bienen höhere Aktivität zeigten als solche aus der Brust, könnte man folgendermaßen zu erklären versuchen. Die Invertase des Auszuges aus dem Hinterleib kann man auf Rechnung des Magens setzen. Die höhere Aktivität des Auszuges aus dem Kopf im Vergleich zu dem aus der Brust könnte dadurch erklärt werden, daß die im Kopf liegenden Speicheldrüsen Invertase ausscheiden, dagegen die in der Brust es nicht tun. Diese Erklärung kann natürlich nur den Charakter einer Annahme haben und müßte durch besondere Versuche gestützt werden. Nachdem so die

¹⁾ *Oppenheimer*, Die Fermente und ihre Wirkungen, S. 88, Leipzig 1910.

²⁾ *Brown* and *Moris*, Journ. chem. Soc. 57, 493, 1890.

³⁾ *Axenfeld*, l. c.

⁴⁾ *Erlenmeyer* und *Planta*, l. c.

allgemeinen Beziehungen zwischen der Invertase und den Teilen des Darmkanals der Biene aufgeklärt waren, versuchten wir durch einige orientierende Versuche die Natur dieses Ferments näher zu studieren. So interessierte uns unter anderem die Frage, welchen Einfluß die Art und Weise der Extraktbereitung auf die Aktivität der Invertase hat. Wie bei den analogen Versuchen mit Katalase¹⁾ benutzten wir Auszüge sowohl aus stark verriebenem Material, wie auch aus solchem, das nur in Teile zerschnitten war.

Die bei dieser Untersuchung erhaltenen Resultate sind in Tabelle II dargestellt.

Tabelle II.

Einfluß der Verreibung der Bienenmagen auf die Aktivität der Invertase.

Zeit der Ausführung des Versuchs	Methode der Bereitung des Auszugs	Konzentration der Zuckerlösung in %	Die Menge der Zuckerlösung in ccm	Die Menge der Fermentauszüge in ccm	Die Dauer der Einwirkung des Ferments	Kontrollversuch	Polarisation			
							verriebenen Magen	unverriebenen Magen	Gemisch der Zuckerlösung mit dem Auszuge aus	
15. IV. 1918	15 Bienenmagen in 7,5 ccm Glycerin + 7,5 ccm Wasser	5	50	5	24	+ 6,00	+ 0,10	- 0,22	+ 0,32	
18. IV.	15 Bienenmagen in 7,5 ccm Glycerin + 7,5 ccm Wasser	5	50	5	24	+ 5,87	+ 2,68	+ 3,36	- 0,66	
18. IV.	15 Bienenmagen in 7,5 ccm Glycerin + 7,5 ccm Wasser	5	50	1	24	+ 6,38	+ 4,65	+ 5,19	- 0,54	
2. VII.	25 Bienenmagen in 25 ccm Glycerin + 25 ccm Wasser	5	50	6	24	+ 5,90	+ 2,18	+ 2,35	- 0,17	
2. VII.	25 Bienenmagen in 25 ccm Glycerin + 25 ccm Wasser	5	50	4	24	+ 6,08	+ 2,39	+ 2,53	- 0,14	
2. VII.	25 Bienenmagen in 25 ccm Glycerin + 25 ccm Wasser	5	50	2	24	+ 6,35	+ 3,52	+ 3,90	- 0,38	

Die Tabelle zeigt, daß im Gegensatz zur Katalase das Verreiben der Gewebe des Darmkanals keinen bemerkbaren Einfluß auf die Aktivität der Invertase hat. Die geringe Differenz, die zwischen der Drehung der Polarisationssebene von Auszügen aus verriebenem und solchen aus unverriebenem Magen beobachtet wurde, erklärt sich wohl aus der Individualität der Bienen.

Die zweite Frage, die uns interessierte, war die, welchen Einfluß die Menge des Auszuges auf den Gang der Zuckerinversion ausübt. In der zu diesem Zweck ausgeführten Versuchsreihe wurden zu gleichen

¹⁾ Sarin, diese Zeitschr. I. c.

Mengen 5proz. Zuckerlösung verschiedene Mengen ein und desselben Auszugs aus dem Bienenmagen zugesetzt. Die Flüssigkeiten wurden 24 Stunden auf 36 bis 38° C gehalten, und dann wurde die Drehung der Polarisationsebene bestimmt.

Die Resultate sind in der Tabelle III angeführt.

Die Betrachtung der Tabelle III ergibt, daß die Menge Invertzucker in der zu prüfenden Flüssigkeit vermehrt wird, wenn man eine größere Menge Extrakt zusetzt. Doch herrscht zwischen diesen beiden Größen keine strenge Proportionalität. Im allgemeinen zeigten alle Analysen, daß die Aktivität des Ferments größer wird, wenn die Auszugsmenge zunimmt. So z. B. bewirkten in den Versuchen 33 und 33a 1 ccm Extrakt eine Verkleinerung des Drehwinkels um 1,63°, 5 ccm desselben Auszugs dagegen um 3,19°.

Ein sehr interessantes Bild erhält man, wenn man berechnet, wieviel Bienenmagen auf eine bestimmte Menge Auszug kommen. Es erweist sich z. B., daß in Versuch Nr. 35 0,1 ccm des Extrakts $\frac{1}{30}$ eines Bienenmagens entsprechen, die in diesem winzigen Stückchen enthaltene Invertasemenge reicht schon hin, um eine Verminderung des Drehwinkels um 0,11° hervorzubringen. Daraus kann man eine Vorstellung von der hohen Aktivität dieses Ferments im Bienenmagen gewinnen.

Bei den planmäßigeren Versuchen Nr. 35 bis 36 erwies es sich, daß größere Auszugsmengen, die zu Zuckerlösungen zugesetzt wurden, die Inversion nicht nur nicht erhöhen, sondern sogar vermindern (Nr. 35g, 35h und 36g, 36h).

Die Ursache dieser auf den ersten Blick sonderbaren Erscheinung könnte entweder die Menge des Ferments sein oder die Menge Glycerin, oder auch die Konzentration der Zuckerlösung, da zu 50 ccm der letzteren von 0,1 bis 25,0 ccm der Auszüge zugesetzt wurden.

Um die wahre Ursache dieser Erscheinung aufzuklären, unternahmen wir nachfolgenden Plan. Es wurden gleichzeitig zweierlei Auszüge von gleicher Konzentration bereitet: bei den ersten wurde als Extraktionsmittel Wasser, bei den zweiten ein Gemisch aus gleichen Teilen Wasser und Glycerin benutzt. Zu 25 ccm einer 10proz. Zuckerlösung wurden wechselnde Mengen (s. Tabelle IV) dieser Extrakte zugefügt und auf 50 ccm gebracht, und zwar durch Versetzung mit der entsprechenden Menge Wasser oder Wasser-Glycerin. Zuletzt hatten alle Proben dieselbe Zuckerkonzentration und sie unterschieden sich nur durch die in ihnen enthaltenen Fermentmengen. Es wurden also zwei Serien von Versuchen ausgeführt: mit Wasser- und mit Wasser-Glycerin-Auszügen. Die erhaltenen Resultate findet man in der Tabelle IV.

Wenn man die Analysenresultate aus der Tabelle IV untereinander vergleicht, kann man mit Sicherheit feststellen, daß in den Wasser-

Glycerin-Auszügen die Inversion nur so lange anwächst, bis der Glycerin-gehalt, berechnet auf die gesamte Flüssigkeitsmenge der Probe, 10% erreicht. Bei größerem Glyceringehalt der Probe nimmt die Aktivität der Invertase merklich ab. Dagegen zeigten die Parallelversuche mit reinen Wasserauszügen, daß der Grad der Inversion mit der Menge von Auszug bzw. Invertase ohne jede Einschränkung zunimmt.

Tabelle IV.

Einfluß des Glycerins auf die Aktivität der Invertase.

Nummer	Methode der Bereitung des Auszugs	Konzentration der Zuckerlösung in %	Die Menge der Zuckerlösung in ccm	Die Menge des Auszugs in ccm	Die Zahl der Bienenmagen in der entsprechenden Menge des Auszugs	Das Volumen beider Mischungen in ccm	Kontrollzuckerlösung	Die optischen Drehungsgrade der Mischung der Zuckerlösung mit dem Auszuge der Bienenmagen nach Verlauf von			
								24 Stunden	Drehungs- winkel	48 Stunden	Drehungs- winkel
37	25 Bienenmagen in 25 ccm Wasser + 25 ccm Glycerin	10	25	1	0,5	50	+ 6,56	+ 6,22	0,34	+ 6,20	0,36
37a		10	25	2	1	50	+ 6,56	+ 6,03	0,53	+ 6,06	0,50
37b		10	25	5	2,5	50	+ 6,56	+ 5,25	1,31	+ 5,19	1,37
37c		10	25	10	5	50	+ 6,56	+ 3,88	2,68	+ 3,90	2,70
37d	25 Bienenmagen in 50 ccm Wasser	10	25	25	12,5	50	+ 6,56	+ 4,12	2,44	+ 4,10	2,46
38		10	25	1	0,5	50	+ 6,54	+ 5,86	0,68	+ 5,90	0,64
38a		10	25	2	1	50	+ 6,54	+ 5,55	0,99	+ 5,57	0,97
38b		10	25	5	2,5	50	+ 6,54	+ 3,67	2,87	+ 3,65	2,89
38c		10	25	10	5	50	+ 6,54	+ 2,76	3,78	+ 2,70	3,84
38d		10	25	25	12,5	50	+ 6,54	+ 0,90	5,64	+ 0,92	5,62

Aus dem eben Dargelegten ist zu ersehen, daß Glycerinzusatz bei Überschreitung einer gewissen Konzentration die Aktivität der Invertase stark hemmt.

Um den Gang der Inversion klarzustellen, wurde die Drehung der Polarisationssebene, die die Einwirkung derselben Auszüge auf dieselbe Zuckerlösung bewirkte, zweimal bestimmt, und zwar nach 24stündiger und nach 48stündiger Einwirkung. Die Tabelle IV zeigt, daß die Invertase nur in den ersten 24 Stunden aktive Wirkungen ausübt, da nach 24 Stunden der Drehwinkel sich nicht mehr änderte, obgleich in den betreffenden Flüssigkeiten noch große Mengen unangegriffenen Zuckers nachblieben. Diese Tatsache wird auch durch die Versuche Nr. 39 bis 45, die weiterhin beschrieben sind, bestätigt (Tabelle V). Um den Einfluß des Lösungsmittels auf die Aktivität der Invertase festzustellen, wurden unter gleichen Bedingungen Auszüge aus 15 Bienenmagen bereitet, und zwar: mit 15 ccm Glycerin und schließlich mit 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung; als Antiseptikum wurden zu jedem Auszuge 5 Tropfen Toluol hinzugefügt. Am nächsten Tage wurden

50 ccm einer 50 proz. Saccharoselösung mit je 5 ccm der erwähnten Auszüge und 10 Tropfen Toluol versetzt, und nach 24 bzw. 48stündigem Stehen bei 36 bis 40° C der Drehwinkel bestimmt.

Die Resultate sind in der Tabelle V verzeichnet.

Tabelle V.

Einfluß des Lösungsmittels auf die Aktivität der Invertase.

Nummer	Zeit der Ausführung des Versuchs	Methode der Bereitung des Auszugs	Konzentration der Zuckerlösung in %			Die optischen Drehungsgrade nach Verlauf von			
			Die Menge der Zuckerlösung in ccm	Die Menge des Fermentauszugs in ccm		24 Stunden		48 Stunden	
						Kontrolllösung	Versuchslösung	Kontrolllösung	Versuchslösung
39	7. VIII. 1918	15 Bienenmagen in 15 ccm Wasser	5	50	5	+ 5,94	+ 2,08	+ 5,93	+ 2,06
40	7. VIII.	15 Bienenmagen in 7,5 ccm Wasser + 7,5 ccm Glycerin	5	50	5	+ 5,92	+ 2,50	+ 5,95	+ 2,50
41	7. VIII.	15 Bienenmagen in 15 ccm Glycerin	5	50	5	+ 5,96	+ 2,92	+ 5,98	+ 3,01
42	21. VIII.	15 Bienenmagen in 15 ccm Wasser	5	50	5	+ 5,90	+ 0,53	+ 5,92	+ 0,51
43	21. VIII.	15 Bienenmagen in 7,5 ccm Wasser + 7,5 ccm Glycerin	5	50	5	+ 5,92	+ 2,40	+ 6,03	+ 2,45
44	21. VIII.	15 Bienenmagen in 15 ccm Glycerin	5	50	5	+ 6,13	+ 3,25	+ 6,15	+ 3,19
45	21. VIII.	15 Bienenmagen in 15 ccm physiolog. Kochsalzlösung	5	50	5	+ 5,75	— 0,25	+ 5,83	— 0,38

Wie ersichtlich, wird die Invertase von allen vier bei der Bereitung der Extrakte benutzten Flüssigkeiten ausgezogen. Es scheint, daß Wasser die am stärksten aktiven, Glycerin die am wenigsten aktiven Auszüge gibt. Doch hat Wasser den Übelstand, daß die Auszüge schnell verderben, und daher ist es zweckentsprechend, Wasser nur dann zu benutzen, wenn ein längeres Aufbewahren des Analysenmaterials nicht erforderlich ist. Ein sehr gutes Lösungsmittel für Invertase ist, was die Haltbarkeit der Auszüge anbetrifft, das Gemisch aus gleichen Teilen Wasser und Glycerin. Die Versuche ergaben, daß die mit diesem Lösungsmittel bereiteten Auszüge ihre ursprüngliche Aktivität mindestens 11 Monate lang behielten (Tabelle VI). Glycerin allein hat den Nachteil, daß es den Gang der Inversion hemmt, wie das aus den Versuchen Nr. 35, 36 und 37 der Tabellen III und IV klar zu ersehen ist. Wie bei den vorhergehenden Versuchen übt die Invertase auch bei verschiedenen Lösungsmitteln eine Wirkung nur in den ersten 24 Stunden aus.

Um die Haltbarkeit der Lösungen dieses Ferments bei längerer Aufbewahrungszeit festzustellen, wurde folgender Versuch unternommen:

Den 16. November 1917 wurde ein Auszug aus 30 Bienenmagen bereitet; als Extraktionsmittel dienten 30 ccm eines Gemisches von Wasser und Glycerin (1:1), wobei noch 10 Tropfen Toluol zugesetzt wurden. Dieser Auszug wurde an einem dunkeln Ort bei Zimmertemperatur aufbewahrt und den 17. November 1917, den 10. April 1918 und den 15. Oktober 1918 auf die gewöhnliche Weise analysiert. Die Resultate dieser Analysen findet man in Tabelle VI.

Tabelle VI.

Aktivität der Invertase bei der Aufbewahrung ihrer Lösungen.

Nummer	Zeit der Herstellung des Auszugs	Methode der Bereitung des Auszugs	Zeit der Ausführung des Versuchs	Die optischen Drehungsgrade					
				Konzentration der Zuckerlösung in ‰	Die Menge der Zuckerlösung in ccm	Die Menge des Fermentauszugs in ccm	Kontrollzuckerlösung	Zuckerlösung mit d. Auszuge	Drehungswinkel
46	15. XI. 1917	30 Bienenmagen in 15 ccm Glycerin + 15 ccm Wasser + 10 Tropfen Toluol	16. XI. 1917	5	50	5	+ 5,65	+ 2,12	3,53
46 a	15. XI.		10. IV. 1918	5	50	5	+ 5,80	+ 2,30	3,50
46 b	15. XI.		15. X.	5	50	5	+ 5,92	+ 2,48	3,44

Aus der Tabelle ersehen wir, daß die Aktivität der Invertase in Lösungen, die mit Wasser und Glycerin bereitet wurden, sich im Laufe von 11 Monaten nicht geändert hatte, wodurch Invertase sich scharf von Katalase unterscheidet¹⁾.

¹⁾ Sarin, diese Zeitschr. I. c.

Untersuchungen über die Wirkung des Thyroxins.

I. Mitteilung¹⁾.

Über die Wirkung des Thyroxins auf Körpergewicht und Leberglykogen
weißer Mäuse.

Von

B. Romeis.

(Aus dem histologisch-embryologischen Institut der Universität München.)

(Eingegangen am 19. Oktober 1922.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Mit der Veröffentlichung *Kendalls*²⁾ über einen von ihm aus der Schilddrüse gewonnenen, kristallisierenden Körper, das Thyroxin, ist die Schilddrüsenfrage zweifellos in ein neues Stadium ihrer Entwicklung getreten. Was die biologische Seite des Problems betrifft, für die es zunächst belanglos ist, ob die von *Kendall* für das Thyroxin angegebene Formel richtig ist oder nicht, so handelt es sich fürs erste darum, in möglichst ausgedehnten Versuchen an Tier und Mensch die Wirksamkeit des neuen Körpers klarzulegen und die Ergebnisse mit den bisher bekannten Wirkungen der Schilddrüse zu vergleichen. Dabei wird sich voraussichtlich auch eine Lösung der wichtigen, noch unentschiedenen Frage ergeben, ob das Thyroxin das vital secernierte Hormon der Schilddrüse darstellt. Ist diese besonders von *Kendall* verfochtene Auffassung richtig, so sind zweifellos durch seine Entdeckung auch neue Einblicke in die zurzeit noch manches Rätsel bergende Wirkungsweise der Drüse selbst zu erhoffen.

Die Zahl der mit Thyroxin ausgeführten Versuche ist noch nicht sehr groß, was in Anbetracht der Kostbarkeit der Substanz als auch der Kürze der seit ihrer Entdeckung veronnenen Zeit erklärlich ist. Zudem sind die bisher bekannt gewordenen Resultate nicht einheitlich. Während *Kendall*³⁾,

¹⁾ Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft Deutscher Wissenschaft. — Das zu den Versuchen benötigte Thyroxin verdanke ich der Liebenswürdigkeit Dr. E. Uhlenhuths, New York.

²⁾ E. C. Kendall, Journ. biol. Chem. 80, 125—147, 1919.

³⁾ Kendall, l. c.; Endocrinology 8, 155—163, 1919.

*Plummer*¹⁾, *Biedl*²⁾, *Romeis*³⁾, *Cameron* und *Carmichael*⁴⁾ eine starke stoffwechselsteigernde Wirkung feststellen, berichtet *Thannhauser*⁵⁾, daß die intravenöse Injektion des ihm zur Verfügung stehenden Thyroxins bei einem Normalen wie bei einem Strumektomierten ohne jeden Einfluß auf Grundumsatz und N-Ausscheidung war. Auch *Eppingers*⁶⁾ Thyroxinversuche verliefen erfolglos. Vermutlich spielen bei diesen sich widersprechenden Ergebnissen neben der Art der Anwendung und Höhe der Dosierung noch individuelle Unterschiede eine Rolle, die ja auch von der Medikation der bisherigen Schilddrüsenpräparate her bekannt sind. Gerade hinsichtlich der individuellen Reaktionsunterschiede ist aber nunmehr eine Erweiterung der jetzigen Kenntnisse zu erhoffen, da jetzt im Thyroxin eine einheitliche, chemisch reine Substanz vorliegt, die bei ihrer eiweißfreien Natur eine genaue subkutane wie intravenöse Dosierung und damit die Ausschaltung schwer berechenbarer Zufälligkeiten erlaubt.

In dieser hier vorliegenden Mitteilung möchte ich zunächst lediglich über den Einfluß des Thyroxins auf Körpergewicht und Leberglykogen bei weißen Mäusen berichten.

Die Wirkung des Thyroxins auf das Körpergewicht.

Versuch 1 bis 5 (Maus Nr. 1 bis 15).

Die für diese Versuche verwendeten weißen Mäuse werden aus den Nachkommen der ersten Generation eines kräftigen Stammpärchens ausgewählt. Jeder Versuch besteht aus drei Tieren, von denen das erste als Kontrolle dient, während das zweite und dritte mit Dijodtyrosin bzw. Thyroxin injiziert wird. Das Geschlecht der Tiere stimmt mit Ausnahme von Versuch 2 innerhalb der einzelnen Versuche überein (Versuch 1 und 3 ♂♂, Versuch 4 und 5 ♀♀). Es wurde darauf geachtet, daß das Gewicht der Tiere innerhalb eines Versuchs möglichst gleich war.

Um das Verhalten der Tiere genau verfolgen zu können, war es nötig, sie in Einzelhaft zu halten. Jede Maus wurde daher in eine mit einem Drahtnetz verschlossene Steingutschale von 1000 ccm Rauminhalt gesetzt, deren Boden mit einer Lage Torfmull bestreut war. Außerdem bekamen die Mäuse etwas Holzwolle zum Nestbau. Die Fütterung erfolgte täglich einmal, und zwar regelmäßig nachmittags 6 Uhr. Als Futter wurden abwechselnd gebähte Semmeln, gebähtes Brot, Weizenkörner, Wasser und Milch verabreicht. Für kurze Zeit erhielten die Tiere auch Speck und Käse. Das Brot wurde aus 250 g Mehl, 20 g Hefe, 35 g Zucker, 25 g Butter, etwas Salz und Milch gebacken, in Scheiben geschnitten und gebäht. Bei Tränkung mit Milch erhielten die Tiere wegen der geringen dabei verabreichten Flüssigkeitsmenge (je 2 ccm) morgens außerdem noch etwas Wasser.

¹⁾ *Plummer*, genannt bei *Kendall*, l. c.

²⁾ *A. Biedl*, Verh. 34. Kongr. d. d. Ges. inn. Med., Wiesbaden 1922; Ber. Klin. Wochenschr. 1, 1281.

³⁾ *B. Romeis*, Klin. Wochenschr. 1, 1262.

⁴⁾ *A. T. Cameron* und *J. Carmichael*, Journ. biol. Chem. 46, 35—52, 1921.

⁵⁾ *Thannhauser*, Verh. 34. Kongr. d. d. Ges. inn. Med., Wiesbaden 1922; Ber. Klin. Wochenschr. 1, 1281.

⁶⁾ *Eppinger*, ebendasselbst.

Durch vorausgegangene Versuche wurde festgestellt, daß 3 g Semmel oder Brot pro Tag ausreichen, um normale Tiere längere Zeit auf ihrem Anfangsgewicht zu halten. Bei gleichzeitiger Verabreichung von 2 ccm Milch genügen 2 g. Die den Tieren während der Versuche zugewogenen Futterportionen entsprechen diesen Feststellungen. Alles weitere kann den Einträgen in den beigegebenen Kurven entnommen werden.

Die Wägung der Tiere erfolgte täglich zur gleichen Zeit, und zwar unmittelbar vor der Fütterung und Einspritzung. Hierauf wurden die Versuchstiere mit Dijodtyrosin bzw. Thyroxin subkutan unter die Rückenhaut injiziert; um ein Ausspritzen der Flüssigkeit aus dem Stichkanal zu verhindern, ein Vorgang, der bekanntlich gerade bei Mäusen sehr leicht eintreten kann, wurde die entstandene Quaddel vor dem Herausziehen der Nadel durch leichtes Kneten vollkommen verrieben. Die zur Injektion verwendeten Lösungen wurden in der Weise bereitet, daß 1 mg Dijodtyrosin bzw. Thyroxin in 10 ccm destillierten Wassers mit einem Glasstab fein verrieben und durch Zusatz von 0,2 ccm einer n/10 NaOH zur Lösung gebracht wurde. Sodann wurde mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt, so daß also 1 ccm einer Lösung 0,01 mg der betreffenden Substanz enthält. Die in einer Einspritzung verabreichte Dosis stieg im Laufe der Versuche von 0,005 auf 0,04 mg. Für die letztgenannte Dosis wurde die Konzentration der Lösung stärker gewählt (4 mg: 100 ccm). Die Einspritzungen wurden in zwei durch eine mehrwöchige Zwischenpause getrennten Perioden vorgenommen. Die erste Injektionsperiode dauerte vom 27. Juni 1922 bis 7. Juli, die zweite vom 29. Juli bis zum Abschluß des Versuchs am 18. August 1922. Während der ersten Periode stieg die Dosierung pro Injektion von 0,005 auf 0,02 mg, während der zweiten von 0,01 auf 0,04 mg. Die genauere Abstufung der Dosierung ist aus den Kurven ersichtlich.

Während der ersten 6 Versuchstage wurden keine Injektionen ausgeführt, um zunächst den Verlauf der Gewichtskurven im allgemeinen zu prüfen. Wie die beigegebenen Kurven zeigen, ergaben sich dabei kleinere tägliche Schwankungen, die sich jedoch bis zum 7. Tag wieder ziemlich ausgeglichen hatten. Die Futterrationen wurden während dieser Zeit von allen Tieren völlig aufgezehrt. Vom 7. Tage an erhielten sie dann an Stelle der Semmel das oben in seiner Zusammensetzung angegebene Brot, das anscheinend nahrhafter war, da die Kontrolltiere von jetzt ab nicht selten kleine Reste davon zurückließen.

Betrachten wir nun zunächst den Verlauf der Gewichtskurve der Kontrolltiere (Versuch 1: Nr. 1; Versuch 2: Nr. 2; Versuch 3: Nr. 3; Versuch 4: Nr. 4; Versuch 5: Nr. 5), so zeigt sich, daß sich das Körpergewicht derselben bei der angegebenen Kost, die nur einmal auf die Dauer je eines Tages durch etwas Speck und Milch ergänzt wird, vom 27. Juni bis 24. Juli auf ziemlich gleicher Höhe hält. Geringere Schwankungen werden immer bald wieder ausgeglichen. Es tritt weder wesentliche Abnahme noch Zunahme ein. Vom 24. Juli an, als die Tiere etwas Käse und dann dauernd 2 ccm Milch statt Wasser erhalten, tritt durchgehends eine beträchtliche Zunahme des Körpergewichts ein, obwohl die Brotration gleichzeitig auf 2 g vermindert wird.

Vergleicht man nun damit die Gewichtskurven der mit Dijodtyrosin eingespritzten Tiere (Versuch 1: Nr. 6; Versuch 2: Nr. 7; Versuch 3: Nr. 8; Versuch 4: Nr. 9; Versuch 5: Nr. 10), so ist der allgemeine Eindruck der, daß ihr Verlauf ziemlich weitgehend dem der Kontrolltiere entspricht.

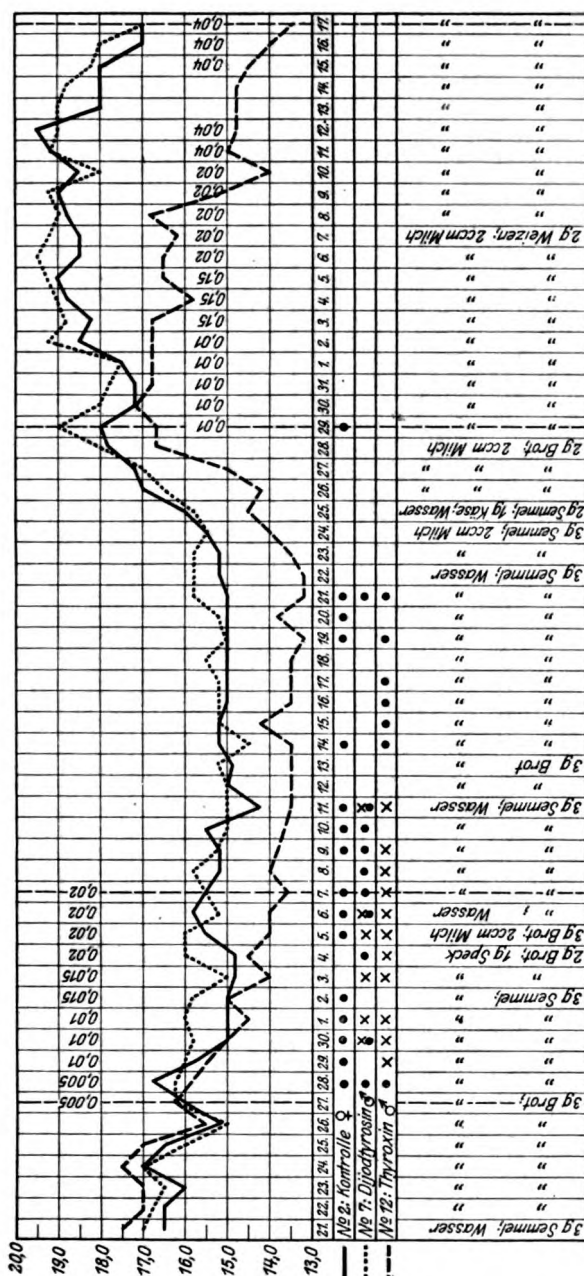


Abb. 2. Auftreten von Durchfall ist mit X, Zurücklassen von Futterresten mit ● gekennzeichnet.

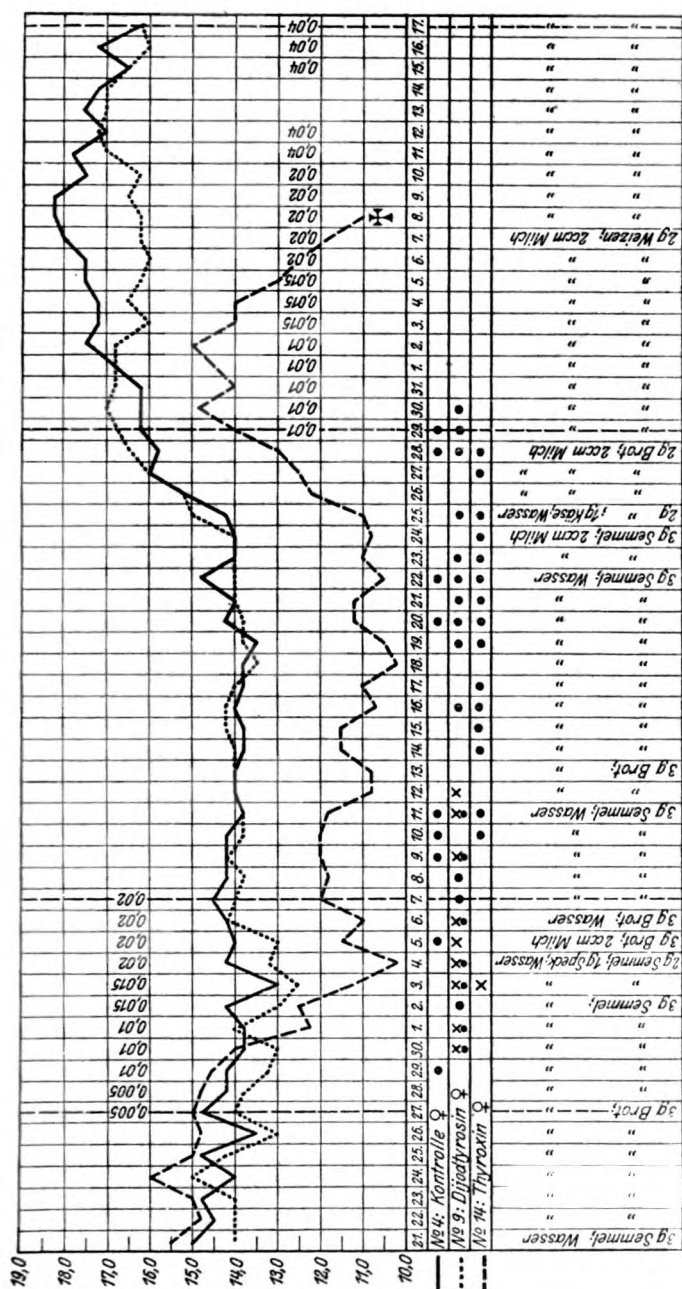


Abb. 4. Auftreten von Durchfall ist mit x, Zurücklassen von Futterresten mit • gekennzeichnet.

Das ist insbesondere in Versuch 2 und 5 der Fall, während in 1, 3 und 4 kleinere Schwankungen stattfinden, die gleich des Näheren besprochen werden sollen. Ich möchte dazu hier wie später bei Erörterung der Thyroxinversuche zwischen drei Zeitabschnitten unterscheiden: der ersten Injektionsperiode vom 27. Juni bis 7. Juli, dem Intervall vom 7. bis 28. Juli und der zweiten Injektionsperiode vom 29. Juli bis zum 17. August. Während der ersten bekamen die Tiere zweimal 0,005 mg, dreimal 0,01 mg, zweimal 0,015 mg und viermal 0,02 mg Dijodtyrosin. Bei den Tieren Nr. 7 und 10 hatten die Einspritzungen keinen Einfluß auf die Gewichtskurve. Bei Nr. 6 und 9 ist das Gewicht während dieser Zeit etwas niedriger, doch ist der Unterschied so gering, daß ihm wohl keine Bedeutung zuzumessen ist. Nur bei Nr. 8 findet ein größerer Gewichtsverlust statt, bei dem es jedoch in Anbetracht des Verhaltens in der zweiten Injektionsperiode sehr ungewiß ist, ob er als Folge der Dijodtyrosineinspritzungen zu betrachten ist.

Während des Intervalls verlaufen die Kurven der Kontrollmäuse und Dijodtyrosinmäuse vollkommen gleichmäßig ohne starke Schwankungen nach oben oder unten. Erst die am Ende dieses Abschnittes erfolgende Verabreichung von Käse und Milch bringt ein rasches starkes Ansteigen des Gewichtes, das bei den Dijodtyrosinmäusen meist sogar etwas rascher erfolgt. Während der zweiten Injektionsperiode, in der die Tiere fünfmal 0,01 mg, dreimal 0,015 mg, fünfmal 0,02 mg und fünfmal 0,04 mg Dijodtyrosin erhielten, verläuft die Gewichtskurve in den Fällen, in welchen sie in der ersten Periode über der Normalkurve lag (Versuche 2, 3 und 5), auch jetzt wieder etwas oberhalb derselben, in den entgegengesetzten (Versuche 1 und 4) etwas unterhalb. Auch jetzt sind aber die Unterschiede nur gering und so wenig gesetzmäßig, daß es berechtigt ist, aus den Versuchen zu schließen, daß *Dijodtyrosin in den verabreichten Mengen bei Mäusen auf den Verlauf der Körpergewichtskurve keinen nennenswerten Einfluß ausübt*, eine Feststellung, die im Hinblick auf die von *Morse*¹⁾ und *Romeis*²⁾ aufgefundene starke Wirkung des Dijodtyrosins im Kaulquappenversuch von Bedeutung ist. Weitere, von *Th. v. Zuehl* ausgeführte, noch nicht veröffentlichte Versuche mit höheren Dosen haben mir aber gezeigt, daß das Dijodtyrosin in stärkerer Konzentration auch bei Mäusen nicht unwirksam ist.

■ Auch die Nahrungsaufnahme wird nicht wesentlich gesteigert, da die Mäuse ebenso wie die Kontrolltiere sowohl während der ersten Injektionsperiode wie im Intervall von ihrer Futterration häufig kleine Reste zurückließen. Als einzige, bei allen Dijodtyrosintieren eintretende Wirkung läßt sich nur das Auftreten von leichtem Durchfall feststellen, der bei den Kontrolltieren während der ganzen Versuchsdauer kein einziges Mal zu beobachten ist, während er bei den Versuchsmäusen vom 4. bis 5. Tage an einsetzte und meist auch noch nach Aussetzen der Einspritzungen während der ersten Tage anhielt. Am übrigen Verhalten der Tiere konnte kein wesentlicher Unterschied gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Sämtliche Tiere sind bei Abschluß des Versuchs noch am Leben. Der Sektionsbefund der am 18. August 1922 getöteten Dijodtyrosinmäuse entspricht völlig normalen Verhältnissen. Die Fettdepots der Tiere sind sehr reichlich. Eine Reizung des Darms ist nicht zu erkennen.

¹⁾ *M. Morse*, Journ. biol. Chem. 19, 1915.

²⁾ *B. Romeis*, Arch. f. Entw.-Mech. 50, 410—467, 1922.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei den mit Thyroxin eingespritzten Mäusen (Versuch 1: Nr. 11; Versuch 2: Nr. 12; Versuch 3: Nr. 13; Versuch 4: Nr. 14; Versuch 5: Nr. 15), obwohl die Dosierung völlig mit jener der Dijodtyrosingruppen übereinstimmt. Schon während der ersten Injektionsperiode treten hier aber auch starke individuelle Unterschiede auf. In Versuch 1 (Maus Nr. 11) macht sich schon unmittelbar nach Beginn eine Gewichtsabnahme bemerkbar, die schließlich beträchtliche Grade erreicht; noch rascher und stärker ist der anfängliche Kurvenabfall bei Maus Nr. 14. In Versuch 2 (Maus Nr. 12) vollzieht sich der Rückgang des Gewichts, der auch im ganzen geringer ist, viel langsamer; bei Maus Nr. 13 (Versuch 3) gleicht sich die anfängliche mäßige Abnahme trotz zunehmender Dosierung gegen Ende der Periode wieder völlig aus, und im Versuch 5 (Maus Nr. 15) stimmt der Verlauf der Kurve weitgehend mit dem der Kontroll- und Dijodtyrosinmäusen des gleichen Versuchs überein. So läßt sich demnach schon während dieser ersten Injektionsperiode eine Reihenfolge von Tieren mit starker und schwacher Reaktion aufstellen.

Das Nahrungsbedürfnis erfährt unter dem Einfluß des Thyroxins eine sichtliche Steigerung; in den meisten Fällen ist die verabreichte Fütterung bis auf das letzte Körnchen aufgezehrt. Mit Ausnahme von Nr. 14 haben die Tiere stark unter Durchfall zu leiden. Sehr auffallend ist ferner die starke Nervosität der Tiere, die insbesondere gegen Ende der ersten Injektionsperiode sehr aufgeregt in ihren Käfigen umherlaufen, sehr leicht erschrecken, bissig sind und beim Wägen nur mit Mühe auf der Wagschale zu halten sind. Auch feiner Tremor des ganzen Körpers ist zu beobachten. Bei Maus Nr. 13 und 15 sind diese Erregungserscheinungen weniger stark ausgeprägt. Das Fell der Tiere ist struppig, wie gegen den Strich gebürstet, und läßt viel Haare.

Die individuellen Unterschiede sind auch während des Intervalls noch deutlich bemerkbar. Besonders bei Nr. 11 nimmt die Abnahme des Körpergewichts selbst nach Aussetzen der Einspritzungen noch ihren Fortgang, bis nach 10 Tagen der tiefste Punkt erreicht ist. Bei Nr. 14, 12 und 13 schreitet die Gewichtsabnahme gleichfalls noch etwas weiter, während sich bei Nr. 15 die Kurve eng an den Verlauf der normalen anschließt. Wie bei den Dijodtyrosin- und Kontrolltieren hat auch bei den Thyroxinmäusen die Zulage von Käse und Milch ein rasches Ansteigen des Gewichts zur Folge, wobei jedoch jene Mäuse, die auf Thyroxin am stärksten reagierten (Nr. 11 und 14), den Verlust am schlechtesten ausgleichen. Während die Kontroll- und Dijodtyrosintiere der gleichen Versuche ihr Anfangsgewicht unter dem Einfluß der verbesserten Ernährung zum Teil beträchtlich überschreiten, erreichen die genannten zwei Thyroxintiere nicht einmal völlig das Anfangsgewicht.

Am 29. Juli setzt die zweite Injektionsperiode ein, in deren Verlauf die bereits festgestellten individuellen Unterschiede wieder in gleicher Weise hervortreten. Bei Nr. 11 und 14, die in der ersten Periode am auffälligsten reagiert hatten, kommt es 9 bzw. 11 Tage nach Wiederaufnahme der Einspritzungen zu plötzlichem Exitus. Maus Nr. 11, die vor der Injektion keine besonders auffälligen Erscheinungen zeigte, fällt wenige Minuten nach derselben plötzlich um und stirbt in wenigen Augenblicken ohne Krampferscheinungen. Die Sektion des Tieres ergibt ein sehr starkes Schwinden der Fettdepots. Herzkammer und Vorhöfe sind stark gefüllt und erweitert, am Darm fällt keine besondere Auftreibung oder Rötung auf. Die Samenblasen und Fettkörper sind sehr klein, beide Hoden schlaff.

Im übrigen ist in Schädel-, Brust- wie Bauchhöhle nichts Besonderes festzustellen. Die Gesamtmenge des in der zweiten Periode diesem Tiere eingespritzten Thyroxins beträgt 0,115 mg, also weniger als bei der ersten Periode. Bei Maus Nr. 14 machte sich bald nach Wiederbeginn der Injektionen ein ziemlich starkes Abnehmen des Körpergewichts bemerkbar. Am 11. Tage bekommt das stark abgemagerte unruhige Tier 20 Minuten nach der Einspritzung heftige klonische Krämpfe, die in etwa einer Minute zum Tode führen. Das Sektionsergebnis stimmt mit dem von Nr. 11 überein, nur ist hier entsprechend dem Geschlecht das periovariäre Fettgewebe stark vermindert. Die Gesamtmenge des seit 29. Juli dem Tiere eingespritzten Thyroxins beträgt 0,155 mg, eine Menge, die es während der ersten Periode noch überwunden hatte.

Bei Maus Nr. 13, die während der ersten Periode einen mäßigen Gewichtsverlust zuletzt wieder ausglich, kommt es bald nach Beginn der Injektionen zu einer Abnahme, die aber erst nach Überschreiten der damaligen Gesamtdosis bei erhöhten Einzeldosen (0,04 mg) in einen rapiden Gewichtsabfall übergeht. Am 13. August ist das stark abgemagerte, sehr unruhige Tier so schwach, daß es fraglich erscheint, ob es die Nacht noch überlebt; es wird daher, um es durch zu langes Liegen nach dem Tode für die histologische Untersuchung nicht zu verlieren, getötet. Der Sektionsbefund ist wie bei Nr. 11. Die Gesamtmenge des ihm seit 29. Juli injizierten Thyroxins beträgt 0,275 mg.

Während diese drei Tiere demnach schon im Verlauf der Injektionsperiode zugrunde gehen, tritt der Einfluß des Thyroxins bei Maus Nr. 12 und 15 langsamer zutage. Die Tiere sind bei Abbruch des Versuchs am 18. August zwar sehr erregt, im übrigen aber nicht so hinfällig wie Nr. 13. Immerhin hat die zuletzt eingetretene Erhöhung der Einzeldosen auf 0,02 und 0,04 mg auch bei ihnen zu einer gesteigerten Gewichtsabnahme geführt, der auch die starke Reduktion des Fettpolsters, die bei der am 18. August 1922 vorgenommenen Sektion festgestellt wird, entspricht. (Gesamtmenge des verabreichten Thyroxins seit 29. Juli 0,395 mg.) Bei Fortdauer der Injektionen wäre wohl in den nächsten Tagen mit dem Tode der Tiere zu rechnen gewesen. Die Sektionsbefunde entsprechen jenen der Mäuse Nr. 11, 12 und 14. Auffallend erscheint, daß die während der ersten Injektionsperiode sowohl bei den Dijodtyrosin- wie Thyroxintieren beobachtete Reizwirkung auf den Darm, diesmal bei beiden Gruppen vollkommen ausgeblieben ist. Ob das mit der Ernährung der Tiere zusammenhängt (Milchzusatz?) oder auf andere Weise zu erklären ist (Gewöhnung oder dergleichen), vermag ich nicht zu entscheiden.

Die Wirkung des Thyroxins auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Leber.

An den oben beschriebenen Mäusen sollte gleichzeitig auch der Einfluß des Thyroxins auf den Glykogengehalt der Leber untersucht werden. Zum Vergleich wurden auch an einigen der Kontrolltiere Glykogenbestimmungen ausgeführt. Die Leber wird dazu unmittelbar nach dem Tode des Tieres entnommen, zerstückelt und nach der von *Abelin* und *Jaffé*¹⁾ genauer beschriebenen Methode in ein gewogenes, 7 ccm heiße 60proz. KOH enthaltendes Hartglasreagenzröhrchen geworfen. Nach nochmaliger Wägung zur Feststellung des Lebergewichts wird das mit

¹⁾ *J. Abelin* und *J. Jaffé*, diese Zeitschr. 102, 39—57, 1920.

einem Glasstöpsel lose verschlossene Röhrchen auf 3 Stunden in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach $\frac{1}{2}$, 1 und 2 Stunden wird das Hydrolysat mit einem Glasstab durchgerührt. Nach Abkühlen wird das Hydrolysat mit 8 ccm destilliertem H_2O in ein Becherglas gespült und mit 30 ccm 96proz. Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird nach mehrstündigem Absetzen vorsichtig auf einem kleinen Filter gesammelt, mit 60proz., 96proz. und absolutem Alkohol wie mit Äther gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Das nun auf dem Filter wie an der Wand des Becherglases haftende Glykogen wird in 90 ccm heißen Wassers gelöst, das Filtrat mit 4 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und 3 Stunden lang im kochenden Wasserbade hydrolysiert. Nach Abkühlen wird die Lösung mit 60proz. KOH auf ganz schwach saure Reaktion gebracht und in einem geeichten Meßkölbchen mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Hierauf wird an drei Proben von je 20 ccm die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* ausgeführt.

Analysen:

Titer der Kaliumpermanganatlösung für alle Bestimmungen: 1 ccm entspricht 13,81 mg Cu.

Maus Nr. 1 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an $KMnO_4$ -Lösung.	1,20
„ 2.	„ „ „ „	1,15
„ 3.	„ „ „ „	1,24
Durchschnitt.		1,20

100 ccm der Lösung enthalten also 43 mg Zucker = 39,86 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 750 mg; Glykogengehalt 5,31 %.

Maus Nr. 2 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an $KMnO_4$ -Lösung.	1,05
„ 2.	„ „ „ „	1,12
„ 3.	„ „ „ „	1,07
Durchschnitt.		1,08

100 ccm der Lösung enthalten also 38,5 mg Zucker = 35,69 mg Glykogen. Gewicht der Leber 680 mg; Glykogengehalt 5,25 %.

Maus Nr. 3 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an $KMnO_4$ -Lösung.	0,92
„ 2.	„ „ „ „	0,88
„ 3.	„ „ „ „	0,87
Durchschnitt.		0,89

100 ccm der Lösung enthalten also 31,3 mg Zucker = 29,02 mg Glykogen. Gewicht der Leber 520 mg; Glykogengehalt 5,58 %.

Maus Nr. 11 (Thyroxin).

Bei der Untersuchung der Leber (Gewicht 480 mg) konnte kein Glykogen nachgewiesen werden.

Maus Nr. 12 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an $KMnO_4$ -Lösung.	0,04
„ 2.	„ „ „ „	0,05
„ 3.	„ „ „ „	0,05
Durchschnitt.		0,05

100 ccm der Lösung enthalten also 1,69 mg Zucker = 1,53 mg Glykogen.
Lebergewicht 650 mg; Glykogengehalt 0,24 %.

Maus Nr. 13 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. .	0,02
„ 2.	„ „ „ „	„ . .	0,02
„ 3.	„ „ „ „	„ . .	0,03

Durchschnitt. . 0,02

100 ccm der Lösung enthalten also 0,69 mg Zucker = 0,63 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 580 mg; Glykogengehalt 0,11 %.

Maus Nr. 14 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. .	0,05
„ 2.	„ „ „ „	„ . .	0,07
„ 3.	„ „ „ „	„ . .	0,05

Durchschnitt. . 0,06

100 ccm der Lösung enthalten also 2,03 mg Zucker = 1,88 mg Glykogen.
Lebergewicht 560 mg; Glykogengehalt 0,34 %.

Maus Nr. 15 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. .	0,10
„ 2.	„ „ „ „	„ . .	0,09
„ 3.	„ „ „ „	„ . .	0,09

Durchschnitt. . 0,09

100 ccm der Lösung enthalten also 3,15 mg Zucker = 2,93 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 600 mg; Glykogengehalt 0,49 %.

Tabelle I.

	Kontrolltiere		
	Maus 1 ♂	Maus 2 ♀	Maus 3 ♂
Körpergewicht vor Tötung . . .	17,0 g	17,0 g	13,8 g
Lebergewicht	750 mg	680 mg	520 mg
Glykogengehalt	39,86 mg	35,69 mg	29,02 mg
Glykogengehalt prozentual zum Lebergewicht	5,31 %	5,25 %	5,58 %

	Thyroxintiere				
	Maus 11 ♂	Maus 12 ♂	Maus 13 ♂	Maus 14 ♀	Maus 15 ♀
Körpergewicht vor Tötung	14,0 g	13,5 g	12,5 g	11,0 g	13,0 g
Lebergewicht	480 mg	650 mg	580 mg	560 mg	600 mg
Glykogengehalt	frei	1,53 mg	0,63 mg	1,88 mg	2,93 mg
Glykogengehalt prozen- tual zum Lebergewicht	0 %	0,24 %	0,11 %	0,34 %	0,49 %
Gesamtmenge des inji- zierten Thyroxins ¹⁾ .	0,115 mg	0,395 mg	0,275 mg	0,155 mg	0,395 mg

¹⁾ Während der zweiten Injektionsperiode; die der ersten ist un-
berücksichtigt.

Aus diesem Ergebnis der Glykogenbestimmungen (s. auch Tabelle I) geht unzweifelhaft hervor, daß das Leberglykogen in den mit Thyroxin injizierten Tieren ganz außerordentlich vermindert ist. Während die Leber der Kontrolltiere sehr reichlich Glykogen enthält, dessen Menge den von anderen Autoren z. B. bei der Ratte festgestellten Verhältnissen durchaus entspricht, ist ihr Glykogengehalt bei Maus Nr. 12 bis 15 bis auf geringe Spuren vermindert; bei Maus Nr. 11 ist sie sogar völlig glykogenfrei.

Versuch 6.

Aufgabe dieses Versuchs war, festzustellen, ob sich der Glykogengehalt der Leber auch noch durch schwächere Thyroxingabe beeinflussen läßt. Die aus zwei Geschwisterwürfen stammenden Mäuse werden in eine Kontrollgruppe (Maus Nr. 16 bis 18) und eine Thyroxingruppe (Maus Nr. 19 bis 24) getrennt, die beide in mit Torfmull und Holzwolle versehenen Glaskästen gehalten werden. Die Mäuse bekommen Semmel, Brot (s. S. 86) und Milch im Überschuß. Die Injektion der Thyroxinlösung (1 mg : 100 cem H_2O) erfolgt wie bei den Versuchen 1 bis 5 spät nachmittags nach vorausgegangener Wägung subkutan unter die Rückenhaut. Die Dosierung ist in der nachfolgenden Tabelle II verzeichnet.

Tabelle II.

Datum	Gewicht der Tiere g									Injektionsmenge mg
	Gruppe a Kontrolle			Gruppe b Thyroxin						
	Nr. 16	Nr. 17	Nr. 18	Nr. 19	Nr. 20	Nr. 21	Nr. 22	Nr. 23	Nr. 24	
	♀	♀	♂	♀	♂	♂	♂	♀	♀	
25. VII.	7,8	12,8	11,2	12,2	11,0	12,2	15,2	15,5	9,5	—
29.	7,0	12,2	11,0	12,8	11,0	12,2	14,8	14,2	10,2	—
30.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,01
31.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,01
1. VIII.	8,3	13,0	12,5	12,6	11,5	14,0	14,8	14,5	11,4	0,01
2.	9,0	13,5	13,2	12,5	11,8	14,8	15,2	14,8	12,0	0,015
3.	9,0	14,5	13,5	12,8	11,8	15,0	16,2	15,5	12,2	0,015
4.	9,5	14,5	13,5	13,0	12,5	14,8	17,0	15,2	12,5	0,015
5.	10,0	14,2	13,7	13,0	12,6	15,0	16,8	15,2	12,3	—

Bei der verhältnismäßig kurzen Dauer des Versuchs und den geringen Dosen (im ganzen 0,075 mg) war von vornherein zu erwarten, daß die in Versuch 1 bis 5 zutage getretene Abnahme des Körpergewichts in diesem Versuch ausbleibt, zumal den Tieren ja auch Futter im Überschuß zur Verfügung stand. Immerhin ist aber auch hier eine gewisse Beeinflussung zu erkennen, insofern die durchschnittliche Gewichtszunahme bei der Thyroxingruppe am Ende des Versuchs geringer ist als bei der Kontrollgruppe (Thyroxingruppe 1,57 g; Kontrollgruppe 2,03 g). Erscheinungen seitens des Nervensystems waren bei diesem Versuch nicht zu beobachten. Die Bestimmung des Glykogens erfolgte an den durch Kopfabschneiden getöteten Tieren wie bei Versuch 1 bis 5.

Analysen.

Maus Nr. 16 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an $KMnO_4$ -Lösung.	0,85
„ 2.	„ „ „ „	0,88
„ 3.	„ „ „ „	0,85
Durchschnitt.		0,86

In der Gesamtlösung also 30,4 mg Zucker = 28,18 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 500 mg; Glykogengehalt 5,63 %.

Maus Nr. 17 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. 1,01
„ 2.	„ „ „ „	. 0,98
„ 3.	„ „ „ „	. 1,08
Durchschnitt.		. 1,02

In der Gesamtlösung also 36,4 mg Zucker = 33,74 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 550 mg; Glykogengehalt 6,13 %.

Maus Nr. 18 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. 1,37
„ 2.	„ „ „ „	. 1,27
„ 3.	„ „ „ „	. 1,27
Durchschnitt.		. 1,31

In der Gesamtlösung also 47,2 mg Zucker = 43,76 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 750 mg; Glykogengehalt 5,83 %.

Maus Nr. 19 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. 0,33
„ 2.	„ „ „ „	. 0,30
„ 3.	„ „ „ „	. 0,34
Durchschnitt.		. 0,32

In der Gesamtlösung also 10,7 mg Zucker = 9,48 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 480 mg; Glykogengehalt 2,01 %.

Maus Nr. 20 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. 1,01
„ 2.	„ „ „ „	. 1,05
„ 3.	„ „ „ „	. 1,00
Durchschnitt.		. 1,02

In der Gesamtlösung also 36,4 mg Zucker = 33,74 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 680 mg; Glykogengehalt 4,96 %.

Maus Nr. 21 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. 0,30
„ 2.	„ „ „ „	. 0,28
„ 3.	„ „ „ „	. 0,30
Durchschnitt.		. 0,29

In der Gesamtlösung also 10 mg Zucker = 9,27 mg Glykogen. Gewicht
der Leber 800 mg; Glykogengehalt 1,16 %.

Maus Nr. 22 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	. 0,58
„ 2.	„ „ „ „	. 0,54
„ 3.	„ „ „ „	. 0,53
Durchschnitt.		. 0,55

In der Gesamtlösung also 18,8 mg Zucker = 17,43 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 850 mg; Glykogengehalt 2,05 %.

Maus Nr. 23 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	0,46
„ 2.	„ „ „ „	0,55
„ 3.	„ „ „ „	0,45
Durchschnitt.		0,49

In der Gesamtlösung also 16,5 mg Zucker = 15,3 mg Glykogen.
Lebergewicht 950 mg; Glykogengehalt 1,60 %.

Maus Nr. 24 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung.	0,27
„ 2.	„ „ „ „	0,31
„ 3.	„ „ „ „	0,32
Durchschnitt.		0,30

In der Gesamtlösung also 10,1 mg Zucker = 9,36 mg Glykogen.
Lebergewicht 650 mg; Glykogengehalt 1,44 %.

Wie die Übersicht in Tabelle III deutlich erkennen läßt, ist der Glykogengehalt der Leber bei den mit Thyroxin injizierten Tieren gegenüber dem der Kontrolltiere deutlich vermindert. Nur bei Maus Nr. 20 ist das Glykogen noch sehr reichlich vorhanden, ohne daß sich aus dem Geschlecht des Tieres oder irgend welchen äußeren Umständen dafür eine Erklärung ergeben würde. Es scheinen eben auch hier individuelle Unterschiede zu bestehen, ähnlich wie sie für das Verhalten des Körpergewichts schon in den vorausgehenden Versuchen festgestellt wurden. Ein Vergleich der absoluten wie relativen Glykogenzahlen dieses Versuchs mit jenen der Versuche 1 bis 5 läßt erkennen, daß das Leberglykogen im Versuch 6 in erheblich schwächerem Maße angegriffen wurde als bei Maus Nr. 11 bis 15. Die Differenz erklärt sich zwanglos aus den niedrigeren Dosen (Versuch 1 bis 5: Gesamtmenge des verabreichten Thyroxins in der zweiten Injektionsperiode: 0,155 bis 0,395 mg; Versuch 6: 0,075 mg).

Tabelle III.

	Kontrollgruppe		
	Maus 16 ♀	Maus 17 ♀	Maus 18 ♂
Körpergewicht vor Tötung	10,0 g	14,2 g	13,7 g
Lebergewicht	500 mg	550 mg	750 mg
Glykogengehalt	28,18 mg	33,74 mg	43,76 mg
Glykogengehalt prozentual zum Lebergewicht	5,63 %	6,13 %	5,83 %

	Thyroxingruppe					
	Maus 19 ♀	Maus 20 ♂	Maus 21 ♂	Maus 22 ♂	Maus 23 ♀	Maus 24 ♀
Körpergewicht vor Tötung	13,0 g	12,6 g	15,0 g	16,8 g	15,3 g	12,3
Lebergewicht	480 mg	680 mg	800 mg	850 mg	950 mg	650 r
Glykogengehalt	9,48 mg	33,74 mg	9,27 mg	17,43 mg	15,3 mg	9,36
Glykogengehalt prozentual zum Lebergewicht	2,01 %	4,96 %	1,16 %	2,05 %	1,61 %	1,44
Gesamtmenge des injizierten Thyroxins	0,075 mg	0,075 mg	0,075 mg	0,075 mg	0,075 mg	0,075

Versuch 7.

Nachdem die im vorausgehenden Versuch eingespritzte Thyroxinmenge nicht ausreichte, um die Leber völlig glykogenfrei zu machen, wurde sie in diesem Versuch verdoppelt (Einzeldosis 0,02 bis 0,04 mg, Gesamtmenge 0,14 mg). Im übrigen waren die Versuchsbedingungen gleich. Kurz nach Beginn der Einspritzungen (vgl. Tabelle IV) ging die kleinste der Thyroxinmäuse (Nr. 27) plötzlich zugrunde; ob infolge der Thyroxinwirkung, kann nicht entschieden werden. Bei der Sektion ließ sich nichts Wesentliches feststellen. Ein zweites Tier (Maus Nr. 29) starb am 6. Tage nach der ersten Einspritzung. Bei diesem waren die Gefäße des Dünndarms, der aufgebläht und mit bräunlicher Flüssigkeit gefüllt war, erweitert. Die Herzkammern standen, wie bei Maus Nr. 11, 13 und 14, in Diastole und waren prall mit Blut gefüllt. Die Fettdepots waren etwas angegriffen, an den übrigen Organen konnten makroskopisch keine wesentlichen Veränderungen aufgefunden werden.

Tabelle IV.

Datum	Gewicht der Tiere g						Injizierte Menge von Thyroxin mg
	Gruppe a Kontrolle		Gruppe b Thyroxin				
	Maus 25	Maus 26	Maus 27	Maus 28	Maus 29	Maus 30	
	♂	♂	♂	♂	♂	♂	
7. VIII.	11,2	9,7	10,8	15,3	12,8	13,6	—
8.	11,0	10,0	11,0	15,6	13,0	14,0	—
9.	11,2	9,8	11,0	15,5	12,8	13,5	0,02
10.	11,2	10,0	11,0	15,5	13,0	12,8	0,02
11.	11,0	9,8	tot	15,2	12,8	14,0	0,02
12.	11,0	9,5		15,8	12,2	13,0	0,04
13.	10,5	9,0		13,2	11,8	12,8	—
14.	10,8	9,0		14,2	11,0	13,0	0,04
15.	11,2	9,5		14,0	tot	12,8	—

Am 15. August werden die noch übrigen Tiere des Versuchs, an denen, abgesehen von einer geringen Abnahme des Körpergewichts, äußerlich keine nennenswerte Beeinflussung zu erkennen ist, getötet. Wie die Sektion ergab, war das Körperfett in mäßigem Grade vermindert, besonders bei Maus Nr. 28, bei der auch die Glandulae vesiculares verkleinert waren. An den übrigen Organen fanden sich keine makroskopisch feststellbaren Veränderungen.

Die wie bei den vorausgehenden Versuchen durchgeführte Untersuchung der Leber auf Glykogen (s. Tabelle V) ergab bei der kurz nach Beginn der Einspritzungen gestorbenen Maus Nr. 27 eine deutliche Verminderung des Glykogengehalts. Extreme Grade erreicht dieselbe bei Nr. 30 und besonders bei Nr. 28 und 29, deren Leber völlig glykogenfrei gefunden wurde. Die verhältnismäßig geringe Menge von 0,14 mg Thyroxin ist also hinreichend, um die Leber der Maus fast völlig glykogenfrei zu machen.

Tabelle V.

	Kontrollgruppe		Thyroxingruppe			
	Maus 25 ♂	Maus 26 ♂	Maus 27 ♂	Maus 28 ♂	Maus 29 ♂	Maus 30 ♂
Körpergewicht vor Tötung	11,2 g	9,5 g	11,0 g	14,0 g	11,0 mg	12,8 g
Lebergewicht	850 mg	400 mg	600 mg	730 mg	680 mg	690 mg
Glykogengehalt	34,21 mg	16,54 mg	6,27 mg	frei	frei	1,88 mg
Glykogengehalt prozentual zum Lebergewicht	4,02 %	4,13 %	1,05 %	0 %	0 %	0,27 %
Gesamtmenge des injizierten Thyroxins	—	—	0,04 mg	0,14 mg	0,12 mg	0,14 mg

Analysen.

Maus Nr. 25 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung. .	1,07
„ 2.	„ „ „ „ . .	1,03
„ 3.	„ „ „ „ . .	1,03

Durchschnitt. . 1,04

In der Gesamtlösung also 36,9 mg Zucker = 34,21 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 850 mg; Glykogengehalt 4,02 %.

Maus Nr. 26 (Kontrolle).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung. .	0,51
„ 2.	„ „ „ „ . .	0,58
„ 3.	„ „ „ „ . .	0,54

Durchschnitt. . 0,52

In der Gesamtlösung also 17,85 mg Zucker = 16,54 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 400 mg; Glykogengehalt 4,13 %.

Maus Nr. 27 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung. .	0,21
„ 2.	„ „ „ „ . .	0,17
„ 3.	„ „ „ „ . .	0,22

Durchschnitt. . 0,20

In der Gesamtlösung also 0,77 mg Zucker = 6,27 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 600 mg; Glykogengehalt 1,05 %.

Maus Nr. 28 und 29 (Thyroxin).

In der Leber (Gewicht 730 und 680 mg) ist kein Glykogen nachweisbar.

Maus Nr. 30 (Thyroxin).

Analyse 1.	Verbrauch an KMnO_4 -Lösung. .	0,07
„ 2.	„ „ „ „ . .	0,05
„ 3.	„ „ „ „ . .	0,06

Durchschnitt. . 0,06

In der Gesamtlösung also 2,03 mg Zucker = 1,88 mg Glykogen.
Gewicht der Leber 690 mg; Glykogengehalt 0,27 %.

Versuch 8.

Nachdem sich in den vorausgehenden Versuchen die allmähliche Einspritzung einer Gesamtmenge von 0,2 bis 0,5 mg Thyroxin mehrmals als tödlich erwiesen hatte, sollte in diesem Versuch noch die Wirkung einer einmaligen Verabreichung von 0,6 bis 0,8 mg geprüft werden. Zum Versuch dienen drei männliche Mäuse (Nr. 31: 10,7 g; Nr. 32: 12 g, beide vom gleichen Wurf; ferner Nr. 33: 21,5 g).

13. Oktober 1922, 11,30 Uhr vormittags: Maus Nr. 31 und 32 je 0,6 mg Thyroxin subkutan. Maus Nr. 33 0,8 mg Thyroxin. Unmittelbar nach der Injektion keine auffallenden Erscheinungen. — 12 Uhr: Herzschlag und Atemfrequenz bei den drei Tieren rascher als vorher. Die Augenlider sind wie bei Lichtscheue zugekniffen. — 3 Uhr nachmittags: unverändert. — 6 Uhr nachmittags, Nr. 31 und 32 erwecken wieder normalen Eindruck; bei Nr. 33 ist die Atmung häufig stoßweise und verlangsamt.

14. Oktober 1922. Nr. 31: 10,5 g; Nr. 32: 11,0 g; Nr. 33: 22,0 g. Nr. 31 und 32 ohne Befund. Bei Nr. 33 verlangsamte, stoßweise Atmung (90 bis 95 in der Minute). Das Tier liegt andauernd schlafend im Käfig.

15. Oktober 1922. Nr. 31: 9,5 g; Nr. 32: 10,5 g; Nr. 33: 21,0 g. Auch bei Nr. 33 sind die Injektionserscheinungen wieder vollkommen abgeklungen.

16. Oktober 1922. Nr. 31: 9,0 g; Nr. 32: 10,8 g; Nr. 33: 21,0 g. Befinden normal.

Ergebnis: 0,6 bzw. 0,8 mg Thyroxin werden bei einmaliger Injektion ohne wesentliche Folgeerscheinungen ertragen¹⁾.

Besprechung der Resultate.

Die vorliegenden Versuche erbringen den Nachweis, daß bei weißen Mäusen erhebliche Unterschiede in der Empfänglichkeit für Thyroxin bestehen, die sich weder aus Geschlechts-, noch Alters- oder Gewichtsunterschieden erklären lassen. An ein Mitspielen des letztgenannten Moments könnte man zunächst deshalb denken, da die injizierte Thyroxinmenge nicht pro Gramm Körpergewicht berechnet wurde, sondern z. B. bei allen Thyroxinmäusen der Versuche 1 bis 5 übereinstimmte, trotzdem das Körpergewicht der Tiere verschieden war. Der Ausfall von Versuch 1 und 5, in welchen die kleinere Maus Nr. 15 relativ mehr Thyroxin erhielt als die größere Nr. 11 und trotzdem schwächer reagierte, zeigt aber, daß Unterschiede im Körpergewicht innerhalb der vorliegenden Grenzen den differenten Ausgang nicht erklären. Da die Tiere des Versuchs 1 bis 5 aus gleich alten Geschwisterwürfen stammen, können auch Altersunterschiede nicht in Betracht gezogen werden. Von Interesse wird für diese Frage auch die spätere histologische Untersuchung der einzelnen Organe sein.

Des weiteren zeigten die Versuche, daß bei weißen Mäusen schon geringe Mengen von Thyroxin (0,005 bis 0,02 mg) bei *mehrmaliger*

¹⁾ Wegen Mangel an Thyroxin ist es mir leider noch nicht möglich gewesen, die bei einmaliger Injektion tödlich wirkende Dosis für Mäuse festzustellen.

subkutaner Einverleibung ein starkes Sinken des Körpergewichts veranlassen können. Die Wirkung des Thyroxins hält nach chronischer Anwendung auch nach Aussetzen der Verabreichung noch ziemlich lange Zeit an; das läßt sich einerseits daraus ersehen, daß die Gewichtsabnahme auch nach der Unterbrechung der Medikation noch fortschreiten kann, andererseits aber daraus, daß in Versuch 1 und 4, als nach 21tägigem Aussetzen die Einspritzungen wieder aufgenommen werden, die Tiere durch Dosen getötet werden, die sie während der ersten Injektionsperiode noch überwunden haben. (1. Injektionsperiode Gesamtmenge des injizierten Thyroxins 0,15 mg; 2. Injektionsperiode, Maus Nr. 11 tot nach: 0,115 mg; Maus Nr. 14, tot nach: 0,155 mg). Über den Einfluß des Thyroxins auf den N- und O-Stoffwechsel, der nach den Untersuchungen *Biedls* erhöht wird, können aus den vorliegenden Versuchen keine Schlüsse gezogen werden. Die bei den Sektionen festgestellte starke Verarmung des Körpers an Fettgewebe beweist, daß die Fettverbrennung unter dem Einfluß des Thyroxins stark gesteigert ist. Der in den Gewichtskurven zutage tretende Gewichtsverlust beruht also sicher nicht lediglich auf vermehrter Wasserabgabe, woran man im Anschluß an die von *Eppinger* festgestellte diuretische Wirkung der Schilddrüsenfütterung denken könnte.

Die Wirkung des Thyroxins stimmt demnach in obigen Punkten mit jener überein, die von *Lanz*¹⁾, *Mayerle*²⁾, *Gottlieb*³⁾, *Carlson, Rooks*, und *Mc Kie*⁴⁾, *Hoffmann*⁵⁾ u. a. durch reichliche Verfütterung von frischer oder getrockneter Schilddrüsensubstanz erzielt wurde, nur daß die zur Erreichung des Resultats benötigte Substanzmenge bei Anwendung des Thyroxins um das Vielfache geringer ist. Das gleiche gilt hinsichtlich der Höhe der Dosis letalis, die im einzelnen aber ebenfalls starken individuellen Schwankungen unterworfen ist. In chronischer Anwendung wirkt bei den empfänglichsten Mäusen schon eine Gesamtmenge von 0,2 bis 0,3 mg tödlich. Es ist nicht ohne Interesse, damit die Mengen zu vergleichen, die *Hoffmann* bei Verfütterung von getrockneter Schilddrüsensubstanz zur Vergiftung seiner Versuchsmäuse benötigte. Sie schwanken je nach Herkunft der dazu benutzten Schilddrüsen-tabletten zwischen 15 bis 58 Stück, eine Menge, die etwa 1,6 bis 10,5 g frischer Schilddrüse entspricht. Bei diesen Dosen trat der Tod zwischen dem 3. und 9. Tag nach Beginn der Fütterung ein. Nur das nach *Notkin*

¹⁾ *Lanz*, Deutsch. med. Wochenschr. 21, 597, 1895.

²⁾ *Mayerle*, Zeitschr. f. klin. Med. 71, 71, 1910.

³⁾ *Gottlieb*, Verh. d. Naturf. u. Ärzte 1911, S. 253.

⁴⁾ *A. J. Carlson, J. R. Rooks and J. F. McKie*, Amer. Journ. Physiol. 80, 129, 1912.

⁵⁾ *J. A. Hoffmann*, Über die Wirkung von Thyreoideatabletten. Diss. Hannover, 1914, S. 1 bis 74.

hergestellte Thyreoidinum depuratum wirkte schon nach 2 Tagen nach Verabreichung von 0,01 bis 0,015 g tödlich.

Von großer Bedeutung ist es, ob die Verabreichung des Thyroxins in einer einzigen Sitzung oder chronisch erfolgt. Mengen, die bei einmaliger Einspritzung ohne wesentliche Störungen vertragen werden, führen bei Verteilung auf mehrere Einzeldosen zum Tode. So rief die einmalige Injektion von 0,6 mg Thyroxin außer einer vorübergehenden Steigerung der Atem- und Pulsfrequenz keine nennenswerten Erscheinungen hervor; selbst 0,8 mg wurden noch überwunden, während bei chronischer Anwendung schon eine Gesamtmenge von 0,2 mg tödlich wirken kann. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Feststellungen *Kendalls*¹⁾ an Ziegen.

Die bei den unter chronischer Thyroxineinwirkung stehenden Mäusen beobachteten nervösen Reizerscheinungen, die sich in Unruhe, Schreckhaftigkeit, Aufregung, Lichtscheue, Zittern und Auftreten von Krämpfen äußern, decken sich mit den Symptomen, die von *Farrant*²⁾, *Hoffmann* u. a. bei starker Schilddrüsenfütterung gefunden und den bei *Basedow* auftretenden Störungen parallel gesetzt wurden.

Für die Erklärung des Todes der Thyroxintiere ist vielleicht die bei allen Sektionen gefundene diastolische Erweiterung der Herzkammer von Bedeutung, die auch *Hoffmann* bei den durch Schilddrüsenfütterung vergifteten Tieren feststellte und die ihn zur Annahme führte, daß der Tod der hyperthyreotisch gemachten Tiere durch Herzparalyse erfolgte. Die von *Hoffmann* bei seinen verendeten Versuchstieren beobachtete starke hyperämische Entzündung von Brust- und Bauchfell fand sich bei den Thyroxinmäusen nicht vor.

Durch die Untersuchungen von *Cramer* und *Krause*³⁾, *M. Parhon*⁴⁾, *S. Kuriyama*⁵⁾ und *Abelin* und *Jaffé*⁶⁾ ist bekannt, daß einige wenige Fütterungen mit frischer oder getrockneter Schilddrüse genügen, um die Leber von Ratten, Katzen oder Kaninchen mehr oder weniger glykogenfrei zu machen, selbst wenn gleichzeitig kohlenhydratreiche Nahrung verabreicht wird. In den vorliegenden Versuchen erweist sich das Thyroxin auch in dieser Hinsicht als außerordentlich wirksam. Die geringe Menge von 0,057 mg ist hinreichend, um den Glykogengehalt der Leber stark herabzudrücken. Die doppelte Menge bewirkt unter Umständen sogar ein völliges Schwinden des Glykogens. Im Hinblick auf die von *Kendall* angegebene Konstitutionsformel des Thyroxins ist

¹⁾ *E. C. Kendall*, *Endocrinology* **3**, 156—163, 1919.

²⁾ *Farrant*, *Brit. med. Journ.* Nr. 2760, 1913.

³⁾ *W. Cramer* und *R. A. Krause*, *Proc. Roy. Soc. ger. B.* **86**, 560, 1913.

⁴⁾ *M. Parhon*, *Journ. Physiol. et Pathol. gener.* **15**, 75, 1913.

⁵⁾ *S. Kuriyama*, *Amer. Journ. Physiol.* **43**, 481—495.

⁶⁾ *J. Abelin* und *J. Jaffé*, *diese Zeitschr.* **102**, 39—57, 1920.

der durch *Abelin* und *Jaffé* erbrachte Nachweis von Interesse, daß auch Thyramin, Phenyl- und p-Oxyphenyläthylamin das Leberglykogen sehr stark angreifen, wenn auch erst bei Mengen, die die Thyroxindosen um das Vielfache übertreffen. Zu gleichen Resultaten führten die Versuche von *Th. v. Zwehl*¹⁾ mit Dijodtyrosin.

Das Ergebnis der vorliegenden Versuche ist demnach, daß die Wirkung des Thyroxins auf Körpergewicht, Fettgewebe und Leberglykogen von Mäusen mit den bisher bei Schilddrüsenverabreichung erzielten Erscheinungen prinzipiell übereinstimmt.

¹⁾ Noch nicht veröffentlicht.

Beitrag zur Kenntnis der chemischen Wärmeregulation der Säugetiere.

III. Wärmeregulation der weißen Ratte.

Von

Kiko Goto aus Japan.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 20. Oktober 1922.)

Die zurzeit bestehenden Schwierigkeiten in der Beschaffung und Erhaltung größerer Versuchstiere machen es oft zur zwingenden Notwendigkeit, sich in Stoffwechselversuchen kleinerer Säugetiere, insbesondere der leicht zu beschaffenden und auch sonst sehr geeigneten weißen Ratten zu bedienen. Da muß es aber als ein Mangel empfunden werden, daß der normale, also unter physiologischen Verhältnissen verlaufende Stoff- bzw. Gaswechsel dieser Tiere nicht so durchgeprüft ist, wie es z. B. durch *Rubner* an Hunden und an Meerschweinchen geschehen ist. Namentlich sind es die Schwankungen der Außentemperatur, die auch unter physiologischen Umständen große Unterschiede im Sauerstoffverbrauche bzw. im Energieumsatze zeitigen können, und wird eine richtige Deutung eines beliebigen Eingriffs nur möglich sein, wenn man in genauer Kenntnis des Verhaltens normaler Tiere über eine sichere Vergleichsbasis verfügt.

Diese Gesichtspunkte sind es, die mich dazu veranlaßten, festzustellen:

1. Ob an weißen Ratten dieselben Gesetzmäßigkeiten bezüglich der physikalischen und chemischen Regulation der Körpertemperatur bestehen wie an größeren Säugetieren?

2. Wie groß der auf die Einheit des Körpergewichts bzw. der Körperoberfläche berechnete minimale Energieumsatz dieser Tiere ist?

3. Welche Außentemperatur es ist, bei der dieser minimale Energieumsatz stattfindet; welche also die kritische Temperatur für weiße Ratten ist?

Versuchseinrichtung.

Um obige Aufgaben zu lösen, habe ich den Gaswechsel hungernder weißer Ratten untersucht, und zwar kamen Tiere zur Verwendung, die nicht weniger als 150 g wogen, also nicht zu jung waren, und die keinerlei Alterserscheinungen zeigten. Da bei dem besonders regen Stoffwechsel dieser kleinen Tiere längeres Hungern einen Zustand zeitigt, der kaum mehr als physiologisch bezeichnet werden kann, war es nicht angezeigt in einer Hungerperiode Versuchsreihen bei verschiedenen Außentemperaturen vorzunehmen. Es schien mir richtiger zu sein, die Tiere jedesmal bloß zwei Tage hungern zu lassen, und an diesen beiden Tagen je einen 7 bis 8 Stunden langen Versuch bei einer bestimmten Temperatur auszuführen. Nach Abschluß einer solchen zweitägigen Hungerperiode wurden die Tiere wieder aufgefüttert und oft erst viel später wieder zu einer Versuchsreihe bei einer anderen Temperatur verwendet.

Der Apparat, der zu diesem Versuch diente, war, von einigen notwendigen Änderungen abgesehen, genau so zusammengestellt, wie dies vor kurzem durch Z. Aszódi¹⁾ beschrieben wurde. In nachfolgender Beschreibung ist das, was von der Aszódischen Einrichtung unverändert übernommen wurde, aus der betreffenden Mitteilung unter Anführungszeichen wörtlich zitiert. Das Tier saß während eines Respirationsversuchs in einem Exsikkator von etwa 6 Liter Rauminhalt ... „mit sorgfältig aufgeschliffenem und eingefettetem Deckel, welch letzterer zudem noch durch Schrauben niedergehalten, luftdicht schloß. Auf absolute Dichtigkeit mußte ich darum bedacht sein, weil ich den Exsikkator, um bei verschiedenen Temperaturen arbeiten zu können, mit Gewichten beschwert ...“, in einem großen eisernen Topf mit zwei einander gegenüberliegenden eingekitteten Seitenfenstern unter Wasser versenkt hielt. In den Versuchen, die bei niederen Temperaturen ausgeführt werden sollten, ließ ich durch den Topf Leitungswasser strömen bzw. setzte auch Eisstücke hinzu; in Versuchen, die bei höherer Temperatur ausgeführt werden sollten, wurde durch eine unter dem Topf befindliche Gasflamme angewärmt. Auf diese Weise erhielt ich alle nötigen Temperaturen zwischen 5 und 33° C.

„Die obere Bohrung des Deckels war durch einen vierfach durchbohrten Gummistopfen verschlossen; durch diesen traten Thermometer, Manometer und je ein Rohr für ein- und austretende Luft. Das Tier wurde nicht frei in den Exsikkator eingesetzt, sondern es saß in einem möglichst leicht gearbeiteten kleinen Käfig aus Drahtgeflecht, in dem der Harn unter Paraffinöl, Kot aber auf einem Drahtgitter ohne Verlust gesammelt werden konnte.“ Zu Beginn und am Ende eines Versuchs wurde der Käfig samt Tier und den allfälligen Dejekten gewogen; außerdem aber auch das Gewicht des Tieres allein am Beginn und Ende jedes Versuchs festgestellt.

Die Ventilation wurde durch eine Wasserstrahlluftpumpe besorgt, die an das Ende des Auffangeapparats angeschlossen war und stündlich etwa 30 Liter Luft durch den ganzen Apparat zog.

Auf diese Weise entstand wohl im Innenraum des Exsikkators, in dem sich das Tier aufhielt, ein konstanter Unterdruck von etwa 40 mm Hg;

¹⁾ Z. Aszódi, diese Zeitschr. 113, 70, 1921.

an den Versuchsergebnissen und den aus ihnen gezogenen Schlüssen wird jedoch hierdurch nichts geändert; denn einerseits ist es ja erwiesen, daß der Gaswechsel unter diesen Umständen, besonders in einem 7 bis 8 Stunden währenden Versuch, keine wesentliche Änderung erleidet; andererseits sind aber meine sämtlichen Versuchsreihen bei dem genannten Unterdruck ausgeführt, daher sie miteinander verglichen werden können.

Um in Versuchen mit niederer Außentemperatur die Bildung von Kondenswasser zu verhüten, wurde folgendermaßen verfahren: „... auf den Käfig kam obenauf ein kleines, flaches, mit CaCl_2 angefülltes Wägegölchen ...“, durch das ein Teil des vom Tiere produzierten Wasserdampfes bereits innerhalb des Exsikkators absorbiert wurde.

Die in den Exsikkator eintretende Luft ging der Reihe nach erst durch eine Waschflasche mit 60proz. Kalilauge, einen Natronkalkturm und zwei Waschflaschen mit konzentrierter Schwefelsäure. Das Absorptionssystem bestand in einer Röhre mit CaCl_2 , das unmittelbar dem Exsikkator angeschlossen war, und einen Teil des Wasserdampfes absorbierend, verhütete, daß sich in den folgenden Röhrenverbindungen Kondenswasser niederschläge.

Hierauf folgten zwei *Voütsche* Kölbchen mit ausgeglühten Bimssteinstücken, die etwa zur Hälfte ihrer Höhe unter konzentrierter Schwefelsäure standen, dann drei U-Röhren mit etwas angefeuchtetem Natronkalk, endlich wieder zwei *Voütsche* Kölbchen mit Bimsstein und Schwefelsäure. Alle angeführten Absorptionsgefäße konnten auf der analytischen Waage gewogen werden; das oben erwähnte, im Exsikkator untergebrachte Wägegölchen mit CaCl_2 wurde während der Wägung selbstverständlich mit dem dazu gehörenden eingeschliffenen Glasstopfen verschlossen gehalten.

Trotz der relativ raschen Ventilation war bereits aus den Ergebnissen der einleitenden Versuche zu schließen, daß die Menge der Kohlensäure und des Wasserdampfes, die am Ende je eines Versuchs beim Sistieren der Ventilation zurückgeblieben war, nicht zu vernachlässigen sei. Diese Restkohlensäure und den Restwasserdampf habe ich nicht eigens durch Analyse bestimmt, sondern durch folgende Berechnung ermittelt. Da ich annehmen durfte, daß die Kohlensäure- und Wasserproduktion während der 7 bis 8 Stunden währenden Versuchsdauer annähernd gleichmäßig ist, konnte ich mir die in den Absorptionsgefäßen aufgefangene Kohlensäure und den Wasserdampf auf das Volumen der während der ganzen Versuchsdauer durch den Exsikkator streichenden Luft verteilt vorstellen; andererseits auch annehmen, daß die am Schluß des Versuchs im Exsikkator verbleibende Luft (etwa 6 Liter) dieselbe prozentuale Zusammensetzung habe wie die Ventilationsluft, die durch den Exsikkator gezogen wurde.

Die Wassermengen, die auf diese Weise errechnet und für die dann entsprechende Korrekturen an den Hauptmengen angebracht wurden, waren in den bei niederer Temperatur ausgeführten Versuchen nicht nennenswert; um so stärker fielen sie jedoch in den Versuchen bei höherer Außentemperatur ins Gewicht.

Auch habe ich mich durch entsprechende Blindversuche davon überzeugt, daß der Apparat auch richtig luftdicht schloß. In diesen Blindversuchen, in denen während der Dauer von etwa 4 Stunden genau in derselben Weise wie in den meritorischen Versuchen ventiliert wurde, betrug die Menge der in den Absorptionsgefäßen aufgefangenen Kohlensäure und des Wassers je etwa 0,01 g, die aber wohl als von unvermeidlichen Versuchs- (Wägungs-) Fehlern herrührend angesehen werden konnten.

Es mußte ferner berücksichtigt werden, daß in den meritorischen Versuchen der Innenraum des Exsikkators zu Beginn des Versuchs von Zimmerluft angefüllt war, die keineswegs als wasserfrei und kohlendioxidfrei gelten konnte. Die Korrektur, die hierfür angebracht werden mußte, war bezüglich der Kohlensäure aus dem durchschnittlichen Kohlensäuregehalt der Zimmerluft, das ist 0,08 %, berechnet, sehr gering: sie betrug nicht mehr als 0,01 g. Weit mehr betrug der Gehalt der Zimmerluft an Wasserdampf, der zu Beginn eines jeden Versuchs bestimmt wurde und, auf den Rauminhalt des Exsikkators berechnet, durchschnittlich 0,05 g ausmachte.

Die Körpertemperatur des Tieres wurde jedesmal, unmittelbar bevor es in den Exsikkator eingesetzt bzw. nachdem es aus dem Exsikkator herausgenommen wurde, im Rektum mittels eines Thermometers bestimmt, das mit einem Gummiring als Marke versehen, jedesmal gleich tief eingeführt wurde. Kotballen im Rektum, die eine genaue Messung unmöglich gemacht hätten, wurden mit einem Glasstabe weggeräumt.

Nachdem alle Absorptionsgefäße auf der analytischen Wage zum mindesten auf 0,001 g, der Käfig samt dem Tiere und seinen Dejekten auf einer empfindlichen Tarawage auf 0,01 g genau gewogen wurden, war es zu erwarten, daß auch der Sauerstoffverbrauch aus den Ausgaben des Tieres und aus seiner Gewichtsveränderung (vom Versuchsbeginn bis zum Versuchsschluß) sich recht genau berechnen ließe; in der Tat bietet die S. 113 besprochene Gleichmäßigkeit der respiratorischen Quotienten eine Gewähr dafür, daß grobe Fehler in der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs so gut wie ausgeschlossen sind (s. hierüber auch weiter unten).

Die Tiere, die zu einem Respirationsversuche dienen sollten, wurden mit Mais, Brot und Käse vorgefüttert und 15 Stunden, ehe der Versuch beginnen sollte, ihnen jedwede Nahrung entzogen; alle weiter unten mitgeteilten Versuche wurden am 1. bzw. 2. Hungertage ausgeführt. Wasser konnten die Tiere bis zum Versuchsbeginn ad libitum trinken.

Die Temperaturen, die im Exsikkator hergestellt wurden und für deren Konstanz innerhalb der Versuchsdauer (mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) gesorgt wurde, betrugen annähernd 5, 13, 20, 25, 28, 30 und 33°C .

Sämtliche Daten der an vier Ratten ausgeführten Versuchsreihen sind in der Generaltabelle am Ende des Textes enthalten, und zwar folgen die an je einem Tiere ausgeführten Versuche einander nach steigenden Umgebungstemperaturen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sollen hier der Reihe nach besprochen werden.

Körpertemperatur. Die an weißen Mäusen unter anderen auch von Aszódi beschriebene Labilität der Körpertemperatur ist auch an weißen Ratten deutlich zu sehen. Vergleicht man nämlich die Körpertemperatur hungriger Ratten vor und nach einem Respirationsversuche, so ergibt

sich im Durchschnitt von je sieben an einem Tiere ausgeführten Versuchen folgendes.

Die Temperatur der Tiere betrug, bevor sie in den Exsikkator eingesetzt wurden:

	Ratte I	Ratte II	Ratte III	Ratte IV
Am 1. Hungertage	34,8	34,9	34,9	34,9
„ 2. „	34,4	34,6	34,7	34,8

Ein Vergleich der beiden Zahlengruppen ergibt demnach, daß die Körpertemperatur der Hungertiere niedriger befunden wurde, als von vielen Autoren angegeben wird. Daß diese niedrige Temperatur nicht vom Hungerzustande herrührt, geht aus Messungen hervor, die ich an gefütterten Tieren vorgenommen habe. Ich habe nämlich an denselben Ratten, die den hier mitgeteilten Hungerversuchen dienten, in anderen derzeit noch nicht abgeschlossenen Versuchsreihen Respirationsversuche in der Weise ausgeführt, daß den Tieren die Nahrung nur unmittelbar vor Versuchsbeginn entzogen wurde. Bei ihrer Gefräßigkeit konnte von diesen Ratten füglich angenommen werden, daß sie jedesmal vor *nicht* allzulanger Zeit Nahrung zu sich genommen hatten, daher man sie wohl als im gefütterten Zustand befindlich ansehen durfte. An diesen Tieren verhielten sich die Temperaturen wie folgt:

An Ratte 5 im Durchschnitt von	6 Versuchen	34,2
„ „ 6 „ „ „	10 „	34,7
„ „ 7 „ „ „	9 „	34,7

also so wie am Hungertier.

Außerdem ergab sich aber auch, daß die Temperatur am zweiten Hungertage noch etwas niedriger ist als am ersten Hungertage.

Ganz anders verhielten sich die Körpertemperaturen der Hungertiere am Ende je eines Respirationsversuchs.

Tabelle I.

Änderung der Körpertemperatur vom Versuchsbeginn bis zum Ende des Versuchs.

Umgebungs- temperatur °C	Ratte I		Ratte II		Ratte III		Ratte IV	
	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag
5	+ 1,0	+ 0,5	- 0,2	0,0	+ 0,5	+ 0,2	0,0	+ 0,3
13	- 0,6	0,0	+ 0,8	0,0	+ 0,3	0,2	+ 0,4	+ 0,9
20	+ 0,3	+ 0,2	0,0	+ 0,1	+ 1,7	+ 1,6	+ 0,7	+ 0,9
25	+ 1,2	+ 0,9	+ 1,3	+ 1,3	+ 0,7	+ 1,9	+ 0,9	+ 1,4
28	+ 1,3	+ 1,4	+ 1,0	+ 0,9	+ 1,5	+ 1,4	+ 1,6	+ 1,2
30	+ 0,9	+ 2,2	+ 1,7	+ 1,9	+ 1,7	+ 1,6	+ 1,7	+ 2,2
33	+ 3,0	+ 3,4	+ 1,5	+ 2,2	+ 3,3	+ 3,6	+ 2,1	+ 1,3

Daß, wie aus voranstehender Tabelle I hervorgeht, bei einer Umgebungstemperatur von 33°C die Körpertemperatur der Tiere eine Zunahme bis um $3,6^{\circ}\text{C}$ aufweist, ist ohne weiteres als *Hyperthermie* aufzufassen, desgleichen auch, daß bei einer Umgebungstemperatur von 30°C eine Zunahme bis um etwa $2,2^{\circ}\text{C}$ erfolgt, was bereits vermuten läßt, daß die für weiße Ratten kritische Umgebungstemperatur unterhalb 30°C gelegen sein muß (worauf wir noch zurückkommen werden). Weniger verständlich ist es, daß eine Zunahme der Körpertemperatur um etwa 1°C auch in einer Umgebung von 25°C stattfindet, ja, ein geringes Ansteigen der Körpertemperatur noch nachzuweisen ist, wenn die Temperatur der Umgebung 5°C beträgt. Ich glaube, daß es sich hierbei um folgendes handelt. Hungernde Ratten haben, wie in weit höherem Grade weiße Mäuse, bei einem längeren ungestörten Aufenthalt bei kühlerer Temperatur die Neigung, in einen halbtorpiden Zustand zu verfallen, wobei ihre Temperatur geringer ist als wenn sie regelmäßig Nahrung zu sich nehmen, bzw. als wenn sie sich frei mehr oder minder lebhaft bewegen. Werden nun die Tiere zum Versuchsbeginn aus dem Behälter genommen, wo sie die vorangehende Nacht in dem erwähnten halbtorpiden Zustande verbracht haben, und wird ihre Temperatur gemessen, so steigt diese während der wenige Minuten dauernden Manipulationen von einer noch niedrigeren Temperatur offenbar um ein Geringes, auf die in der Generaltabelle ersichtlichen Werte, an. Am Ende je eines Versuchs dauert aber die Störung, durch die das Tier aus dem torpiden Zustande aufgeschreckt wird, länger an, da ja das Öffnen des Exsikkators, die Herausnahme und Gewichtsbestimmung des Käfigs, Herausnahme des Tieres aus dem Käfig, die Temperaturbestimmung selbst, weit länger andauern. Jedenfalls geht aus diesen Beobachtungen hervor, daß man in der Beurteilung der Körpertemperatur weißer Ratten behutsam sein muß und den soeben erörterten Umstand eigentlich nie außer acht lassen sollte.

Der respiratorische Quotient. Der respiratorische Quotient diene uns in erster Linie dazu, um zu beurteilen, ob die Werte, die den Sauerstoffverbrauch darstellen sollen und die ja in unseren Versuchen nicht direkt bestimmt, sondern durch Berechnung (also indirekt) erhalten wurden, auch richtig seien. Ist nämlich die Bestimmung der Gewichtsveränderung des Tieres, oder der produzierten Kohlensäure, oder aber des ausgegebenen Wasserdampfes unrichtig, so ist auch der für den Sauerstoffverbrauch berechnete Wert falsch. Dies wird (weniger wenn die Kohlensäurewerte, in weit höherem Grade, wenn die beiden anderen Werte unrichtig sind) daran zu erkennen sein, daß der respiratorische Quotient ungewöhnlich hoch oder niedrig ausfällt. Insbesondere wird man an Hungertieren jeden Versuch, der am ersten bzw. zweiten Hungertage

Werte ergibt, die wesentlich höher oder niedriger als 0,71 bis 0,75 ausfallen, als mißlungen ansehen dürfen.

Aus diesem Gesichtspunkte betrachtet, wird man aber sagen müssen, daß der Sauerstoffverbrauch in keinem einzigen meiner in die Generaltabelle aufgenommenen Versuche unrichtig ist, höchstens, daß an jedem Tiere einige Versuche einen Fehler von einigen Prozenten aufweisen. Denn es fanden sich unter je 14 an je einem Tiere erhaltenen respiratorische Quotienten:

	0,71 bis 0,75	0,69 und 0,70
An Ratte I	13 mal	1 mal
„ „ II	9 „	5 „
„ „ III	10 „	4 „
„ „ IV	12 „	2 „

also 44 tadellose Versuche und 12 solche, in denen der Wert des verbrauchten Sauerstoffs mit einem maximalen Fehler von einigen Prozenten behaftet sein dürfte.

Es braucht wohl nicht besonders betont zu werden, daß es auch schlechte Versuche gab; diese wurden jedoch an dem respiratorischen Quotienten sofort als solche erkannt. So erhielt ich z. B. nach einer Reihe von guten Versuchen ganz unvermittelt solche, in denen der Quotient 0,60 betrug, dem dann hintereinander mehrere ganz ähnliche folgten; oder aber in ganz analoger Weise Versuche mit Quotienten, die gegen 0,8 betrugen. Jedesmal ließ sich dann alsbald nachweisen, daß der Apparat ein Gebrechen habe, und sobald das Gebrechen behoben war, stellten sich wieder die alten richtigen Quotienten ein. All diese sicher schlechten Versuche wurden in die Generaltabelle nicht aufgenommen und blieben in dieser Mitteilung auch sonst unberücksichtigt.

Sauerstoffverbrauch und Energieumsatz. Aus den soeben dargetanen Gründen durfte ich den Sauerstoffverbrauch als verlässlichen Maßstab des Energieumsatzes betrachten und auf die bekannte Weise den kalorischen Wert des verbrauchten Sauerstoffs auf den respiratorischen Quotienten basieren. Allerdings hätte ich, um diese Berechnung auszuführen, aus den für Kohlensäureproduktion und Sauerstoffverbrauch erhaltenen Werten noch die Kohlensäure und den Sauerstoff abziehen müssen, die auf zersetztes Eiweiß entfallen; und erst aus diesem Restbetrag des Sauerstoffverbrauchs hätte ich mit Hilfe des neugebildeten respiratorischen Quotienten die Berechnung auf Grund der bekannten Tabelle ausführen dürfen.

Die Respirationsversuche waren auch in der Tat so eingerichtet, daß der Harn quantitativ gesammelt werden konnte, und ich habe den Harn auch von den restlichen 17 bzw. 16 Stunden des Tages, die

das Tier außerhalb des Exsikkators zubrachte, sorgfältig gesammelt. Nichtsdestoweniger ergaben die pro je 24 Stunden bestimmten Harnmengen nicht nur an verschiedenen Tieren, sondern auch am selben Tier an verschiedenen Versuchstagen solche Unstimmigkeiten und derart große Schwankungen, daß die Vernachlässigung des zersetzten Eiweißes in obiger Berechnung sicherlich einen geringeren Fehler involviert als die Berechnung aus derart schwankenden Werten, zumal sie sich, wie erwähnt, nur zu einem geringeren Anteile auf die Dauer des Respirationsversuchs selbst beziehen.

Der aus dem Sauerstoffverbrauch pro 24 Stunden und 1 qm Körperoberfläche berechnete und in Kilogrammkalorien ausgedrückte Energieumsatz hatte in den bei verschiedenen Umgebungstemperaturen ausgeführten Versuchen nachfolgende, in Tabelle II zusammengestellte Werte:

Tabelle II.

Umgebungs- temperatur °C	Ratte I		Ratte II		Ratte III		Ratte IV	
	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag
5	2019	1904	1942	1848	1945	1844	2059	1995
13	1625	1615	1628	1571	1596	1595	1539	1430
20	1293	1001	1186	1089	1228	1092	1111	1051
25	896	929	976	834	943	966	926	891
28	915	818	845	789	904	869	909	880
30	955	832	896	908	972	966	945	952
33	1120	974	1062	982	1197	1049	1213	1027

Den Daten dieser Tabelle ist folgendes zu entnehmen: 1. Es ist natürlich durchaus aussichtslos, aus den bei verschiedenen Umgebungstemperaturen erhaltenen Werten einen Mittelwert berechnen zu wollen, der dann für den Energieumsatz des Tieres charakteristisch sein sollte; denn ein solcher Mittelwert hätte keinen physiologischen Sinn. Nichtsdestoweniger habe ich in nachstehender Zusammenstellung diese Mittelwerte, und zwar die vom ersten und zweiten Hungertage getrennt berechnet, weil aus ihnen in *versuchstechnischer* Beziehung wohl Schlüsse gezogen werden können.

	Ratte I	Ratte II	Ratte III	Ratte IV
Am 1. Hungertage	1260	1219	1255	1243
" 2. "	1152	1145	1197	1168
" 2. " im Vergleich zum 1.	— 8,5 %	— 6,0 %	— 4,6 %	— 6,0 %

Obige Zahlen lassen deutlich erkennen, daß der Unterschied zwischen den an vier verschiedenen Tieren erhaltenen Werten am ersten

Hungertage weniger als $3\frac{1}{2}\%$, am zweiten Hungertage etwas mehr als $4\frac{1}{2}\%$ beträgt; daß also eine vorzügliche Übereinstimmung zwischen den vier Versuchsreihen vorhanden ist. Besonders wichtig ist ein weiteres Moment, bestehend daraus, daß der Energieumsatz der Tiere am zweiten Hungertage um $4\frac{1}{2}$ bis $8\frac{1}{2}\%$ niedriger ist als am ersten Hungertage. Dieses Moment ist wohl zu beachten, wenn man den Einfluß gewisser Eingriffe auf den Energieumsatz an Ratten prüfen will. Größere Versuchstiere läßt man nämlich so lange (drei bis vier Tage) hungern, bis ihr Energieumsatz ein gleichmäßiger geworden ist; auf welcher Basis dann die etwaige Wirkung eines Eingriffs sicher beurteilt werden kann. Kleinere Tiere, darunter auch weiße Ratten, vertragen aber kein tagelanges Hungern; prüft man daher die Wirkung eines Eingriffs an der Ratte am zweiten Hungertage, so ist der Erfolg aus dem Grunde allein schon schwer zu beurteilen, weil der Energieumsatz an diesem Tage ohnehin bereits geringer ist als am ersten Hungertage.

2. Das Minimum des Energieumsatzes findet man in vorzüglicher Übereinstimmung in sieben von acht Versuchsreihen bei 28°C und auch in dem einzigen Versuch, der diesbezüglich von den anderen abweicht, indem sich hier (erster Hungertag an Ratte I) das Minimum bei 25°C findet; doch ist der Energieumsatz bei 25 bloß um etwa 2% niedriger als bei 28°C , so daß man hier füglich an ein störendes Nebenmoment (Versuchsfehler; Unruhe des Tieres) denken kann.

Auf Grund dieser Daten darf es also als gesichert angesehen werden, daß die kritische Umgebungstemperatur für erwachsene weiße Ratten um 28°C gelegen sein muß; richtiger, daß sie über 25°C und unter 30°C gelegen ist. Und zwar beträgt der minimale Energieumsatz bei dieser Umgebungstemperatur an vier Tieren am ersten Hungertage durchschnittlich 898 kg-Cal. , am zweiten Hungertage durchschnittlich 841 kg-Cal. pro 24 Stunden und 1 qm Körperoberfläche.

3. Die chemische Regulation der Körpertemperatur setzt an weißen Ratten, sobald die Temperatur der Umgebung unter die kritische Grenze sinkt, prompt ein, so daß der Energieumsatz aller vier Ratten bei 5°C auf mehr als das Doppelte angewachsen ist. Aus diesen Daten ergibt sich, daß der auf 1 Grad des Temperaturabfalls berechnete Zuwachs im intervall zwischen 28° und 5° folgende Werte hat:

	Ratte I %	Ratte II %	Ratte III %	Ratte IV %
Am 1. Hungertage	5,3	5,7	5,0	5,5
„ 2. „	5,8	5,8	4,9	6,1

also im Mittelwert $5,5\%$.

Im Intervall zwischen 28° und 13° aber

	Ratte I %	Ratte II %	Ratte III %	Ratte IV %
Am 1. Hungertage .	5,2	6,2	5,1	4,6
„ 2. „	6,6	6,6	5,6	4,8

also im Mittelwert 5,6%.

Ähnliche Werte erhält man auch bei der Berechnung der kleineren Intervalle, nur gibt es da größere Schwankungen, was ja selbstverständlich ist, da ja dieselben unvermeidlichen Versuchsfehler hier weit mehr ins Gewicht fallen.

4. Das an anderen Säugern konstatierte oberhalb der kritischen Grenze gelegene Intervall der Umgebungstemperatur, in dem der Energieumsatz nicht weiter eingeschränkt werden kann, die Körpertemperatur jedoch durch Steigerung der *Wärmeabgabe*, also durch physikalische Regulation konstant erhalten wird, scheint an der weißen Ratte ein recht geringes zu sein. In diesem Intervalle muß nämlich, da die Wärmeproduktion unverändert bleibt, die Menge der durch Strahlung und Leitung ausgegebenen Wärme aber eingeschränkt ist, eine entsprechende Steigerung der Wasserdampfabgabe stattfinden. Eine solche Steigerung der Wasserdampfabgabe ist von 28° aufwärts auch an weißen Ratten wohl zu konstatieren, doch ist die Wärmeproduktion *nicht unverändert*, im Gegenteil bereits erhöht, wenn die Umgebungstemperatur auf 30° C ansteigt, noch stärker in einer Umgebungstemperatur von 33° C. Und zwar beträgt die Zunahme im Intervalle von 28° bis 33° pro 1 Grad der Temperaturerhöhung

	Ratte I %	Ratte II %	Ratte III %	Ratte IV %
Am 1. Hungertage .	4,5	5,1	6,5	6,7
„ 2. „	4,0	4,9	4,2	4,7

Im Mittelwert beträgt also der Zuwachs 5,1%.

Daß die physikalische Regulation der Körpertemperatur an der Ratte bei Umgebungstemperaturen über 28° C nicht gelingt, geht bereits aus der zuvor besprochenen Tatsache hervor, daß bei 30° C eine recht starke, bei 33° C aber eine noch weit stärkere Hyperthermie der Ratten sich einstellt. Dann kann aber die Wärmeproduktion nicht unverändert bleiben; denn bei steigender Körpertemperatur gehorchen die Oxydationen dem auch im Tierkörper gültigen Gesetze, wonach Erhöhung der Temperatur mit einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit einhergeht.

5. Wenn wir nun sehen, daß es den Ratten nicht gelingt, ihre Körpertemperatur bei oberhalb von 28° gelegenen Umgebungstemperaturen

durch physikalische Regulation konstant zu erhalten, so ist damit nicht gesagt, daß im Rattenorganismus die entsprechenden Vorgänge überhaupt fehlen. Dies soll in nachstehendem gezeigt werden.

Die Menge der in den Expirationsgasen in Dampfform abgegebenen Wasserdampfes wies in dem zwischen 28° und 5° C gelegenen Intervalle der Umgebungstemperatur unregelmäßige Schwankungen auf und war eine Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur nicht zu erkennen; vergleicht man die Mittelwerte der auf 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht berechneten Wasserdampfabgabe in sämtlichen zwischen 28° und 5° C ausgeführten Versuchen, und zwar gesondert die vom ersten und die vom zweiten Hungertage, so erhält man folgendes Bild:

	Ratte I g	Ratte II g	Ratte III g	Ratte IV g
1. Hungertag	52,9	48,0	44,5	44,6
2. „	45,5	41,7	45,4	39,6

Auf dieser Basis läßt sich dann die mächtige Zunahme der Wasserdampfabgabe berechnen, wenn die Umgebungstemperatur auf 30° bzw. 33° C ansteigt. Und zwar beträgt der Zuwachs, wie aus nachfolgender Tabelle III ersichtlich:

Tabelle III.

Umgebungs- temperatur ° C	Ratte I		Ratte II		Ratte III		Ratte IV	
	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag
	%	%	%	%	%	%	%	%
30	67	37	77	66	147	98	85	133
33	436	209	335	315	463	355	466	547

In dem zwischen 28° und 5° C gelegenen Intervalle der Umgebungstemperatur spielt demnach die physikalische Regulierung der Körpertemperatur, soweit es sich um Wasserverdampfung handelt, *keinerlei Rolle*; sobald jedoch die kritische Umgebungstemperatur überschritten ist, ist die Beteiligung der Wasserverdampfung an der Wärmeabgabe eine um so größere.

Dies geht aus umstehender Tabelle IV klar hervor. Ich habe nämlich aus der pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht berechneten Menge des abgegebenen Wasserdampfes die Wärmemengen berechnet, die auf diesem Wege abgegeben wurden, und sodann das prozentuale Verhältnis zwischen dieser Wärmemenge und der gesamten Wärmeabgabe des Tieres berechnet. Die starke Verschiebung in der Beteiligung der Wasserverdampfung an der gesamten Wärmeabgabe, sobald die kritische

Tabelle IV.

Umgebungs- temperatur ° C	Ratte I		Ratte II		Ratte III		Ratte IV	
	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag	1. Hunger- tag	2. Hunger- tag
	%	%	%	%	%	%	%	%
5	9,4	11,6	7,1	7,2	7,2	7,8	8,7	7,4
13	10,3	8,7	8,6	13,0	10,9	11,0	9,3	8,9
20	13,9	12,8	24,4	14,6	13,2	12,0	14,7	11,8
25	18,8	20,6	23,8	20,7	18,3	19,3	16,5	16,1
28	20,1	17,6	22,7	12,8	19,6	17,5	18,8	19,6
30	35,1	34,5	33,7	26,8	42,5	28,7	31,9	34,4
33	71,4	73,9	93,7	52,1	79,7	63,1	77,2	89,8

Temperatur überschritten ist, geht aus dieser Zusammenstellung deutlich hervor; die Werte jedoch, die sich auf Umgebungstemperaturen unterhalb der kritischen Temperaturgrenze ergeben, könnten zu einem Trugschlusse führen. Dadurch nämlich, daß, wie oben erwähnt, von 28° bis herab zu 5° C die um einen relativ geringen Mittelwert unregelmäßig schwankenden Werte der Wärmeverdampfung *keinerlei Abhängigkeit* von der Umgebungstemperatur aufweisen, die Wärmeproduktion jedoch mit sinkender Umgebungstemperatur eine starke und regelmäßige *Zunahme* erfährt, ergibt sich bezüglich des Anteils, der von der gesamten Wärmeabgabe auf die Wasserverdampfung entfällt, eine im großen und ganzen fortschreitende Abnahme. Hieraus könnte der Schluß gezogen werden, daß auch hier regulatorische Vorgänge im Spiele sind, während es jedoch klar ist, daß die Wasserverdampfung in diesem Temperaturbereiche keinerlei Tendenz zu einer proportionalen Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur aufweist, und nur ihre prozentuale Beteiligung an der proportional sich ändernden gesamten Wärmeabgabe eine fortschreitende Verschiebung erleide. Von einer wirklichen Regulation durch Wasserverdampfung kann also bloß bei Umgebungstemperaturen oberhalb der kritischen Grenze die Rede sein.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. *An der erwachsenen weißen Ratte tritt bei sinkender Umgebungstemperatur (bis herunter zu 5° C untersucht) eine prompt wirkende chemische Regulation der Körpertemperatur ein.*

2. *Die kritische Umgebungstemperatur befindet sich für diese Tiere bei etwa 28° C.*

3. *Oberhalb der kritischen Temperaturgrenze treten physikalische Vorgänge (Wasserverdampfung) in Wirksamkeit, die eine Regulation der Körpertemperatur bezwecken sollen. Daß diese nicht hinlangen, um die*

Körpertemperatur der Ratten am normalen Stand zu erhalten, ist wahrscheinlich der Labilität ihrer Körpertemperatur zuzuschreiben.

4. Der minimale Energieumsatz weißer Ratten beträgt auf die Einheit des Körpergewichts (1 kg) bezogen am ersten Hungertage 133 bis 142, am zweiten Hungertag 125 bis 131 kg-Cal.; auf die Einheit der Körperoberfläche (1 qm) bezogen am ersten Hungertage 845 bis 916, am zweiten Hungertage 789 bis 869 kg-Cal.; hat also einen etwas geringeren Wert, als an vielen anderen bisher untersuchten Säugetieren bzw. homöothermen Tieren gefunden wurde.

Datum des Versuchs	Dauer des Versuchs	Temperatur im Exsikkator °C	Wasser- halt g	Mittleres Körper- gewicht	Körper- temperatur am Versuchs-		Gewicht des Käfigs + Tier (+Dejekte) am Versuchs-		Während des Versuchs				Pro 24 Stunden und 1 kg Körpergewicht				Pro 24 Stunden und 1 qm Körper- oberfläche	
					Beginn °C	Ende °C	Beginn g	Ende g	ausgegeben		ver- braucht	R Q	ausgegeben		ver- braucht	Energie- umsatz g	Energie- umsatz kg-Cal	
									H ₂ O	CO ₂			H ₂ O	CO ₂				H ₂ O
Ratte III.																		
2. V.	7	5,0	1	228,3	35,1	35,6	678,34	675,99	2,372	5,790	5,81	0,73	35,71	86,95	87,25	289,7	239,3	1946
1. III.	8	5,5	2	162,23	35,5	35,7	602,88	599,39	3,314	5,457	5,28	0,75	61,29	100,9	97,64	325,8	367,3	1845
8. III.	8	13	1	182,94	35,3	34,2	623,10	620,17	2,920	4,711	4,70	0,72	47,89	77,31	77,07	255,2	299,2	1596
9. III.	8	12	2	172,23	34,5	34,2	618,10	615,97	2,237	4,438	4,55	0,71	38,97	77,31	79,17	267,6	238,2	1595
16. III.	8	20	1	186,3	36,2	36,2	622,55	619,50	3,086	6,335	3,67	0,72	49,68	58,54	59,10	195,7	278,0	1228
28. IV.	7	20	2	221,36	33,9	35,5	670,98	668,76	2,964	3,108	3,22	0,70	36,94	48,15	49,89	164,4	240,0	1093
29. IV.	7	25	1	231,36	35,2	36,4	682,92	680,02	2,964	2,793	2,86	0,71	44,13	41,39	42,34	139,8	296,3	943
25. III.	8	25	2	187,64	34,5	36,4	631,35	628,30	3,123	2,829	2,90	0,71	49,93	45,23	46,37	153,2	342,0	966
22. IV.	7	28	1	228,78	35,0	36,5	673,42	669,36	3,019	2,738	2,70	0,74	45,24	41,02	40,40	134,4	304,1	904
23. IV.	7	28	2	218,56	35,0	36,4	662,24	659,75	2,528	2,489	2,53	0,72	39,66	39,04	39,63	131,2	262,7	869
1. IV.	7	30	1	203,29	35,3	37,0	649,97	643,52	2,532	2,625	2,71	0,70	110,16	44,12	45,70	150,6	711,8	973
2. IV.	7	30	2	195,31	35,3	36,9	638,55	633,51	5,124	2,537	2,62	0,70	89,95	44,54	46,00	151,6	573,5	966
13. IV.	8	33	1	212,05	34,7	38,0	654,98	636,50	17,714	3,783	3,92	0,70	250,60	53,52	55,46	182,7	1642,3	1198
14. IV.	7	33	2	202,33	34,4	38,0	653,62	641,40	12,204	2,901	2,89	0,73	206,80	49,17	48,98	162,6	1334,3	1049
Ratte IV.																		
6. III.	8	5,5	1	163,96	36,3	36,3	603,82	601,10	2,172	5,486	5,56	0,72	51,09	100,4	101,7	336,8	307,3	2060
7. III.	8	5	2	152,36	35,0	35,3	586,82	584,72	2,795	5,138	5,21	0,72	42,83	101,3	102,7	339,9	251,4	1995
26. III.	7	13	1	209,36	34,0	34,4	662,80	660,63	2,314	4,230	4,27	0,70	37,90	69,28	71,54	235,8	247,3	1539
27. III.	7	13	2	200,76	33,9	34,8	653,04	651,16	1,946	3,866	3,93	0,72	33,23	66,32	67,10	222,2	213,8	1430
14. III.	8	20	1	173,8	34,5	35,2	618,70	616,05	2,665	3,179	3,19	0,72	46,00	54,88	55,13	182,6	279,9	1111
15. III.	8	20	2	164,51	34,4	35,3	607,36	605,45	1,932	2,846	2,87	0,72	35,23	51,90	52,30	173,2	213,8	1051
22. III.	8	25	1	175,77	34,5	35,4	615,22	612,76	2,500	2,621	2,66	0,72	42,67	44,74	45,41	150,4	262,7	926
23. III.	8	25	2	166,81	34,8	36,2	609,90	607,72	2,261	2,405	2,49	0,70	40,67	43,25	44,69	146,9	246,0	891
18. IV.	7	28	1	203,01	34,4	36,0	647,60	644,92	2,689	2,922	2,51	0,73	45,42	42,60	42,35	140,6	293,3	909
19. IV.	8	28	2	194,22	35,2	36,4	638,22	635,42	2,851	2,505	2,56	0,71	44,04	38,69	39,48	130,4	280,3	830
30. III.	8	30	1	190,58	35,5	37,2	633,96	628,77	5,136	2,863	2,81	0,74	82,68	46,12	45,27	150,7	518,9	945
3. III.	8	30	2	177,85	34,7	36,9	627,57	622,18	5,402	2,744	2,76	0,72	91,12	46,28	46,56	154,2	563,1	953
9. IV.	7	33	1	196,09	35,4	37,5	640,60	626,26	14,437	3,195	3,29	0,71	252,4	55,86	57,52	190,0	1611,4	1213
0. IV.	8	33	2	183,5	35,3	37,5	634,82	619,26	15,625	3,043	3,03	0,73	253,8	49,75	49,52	164,4	1585,0	1027

Der Kreatingehalt des Muskels bei anoxybiotischer Zuckung.

Von

E. A. Spiegel und A. Löw.

(Aus dem neurologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 27. Oktober 1922.)

Trotz der zahlreichen Untersuchungen, welche den Mitteilungen von *Pekelharing* und *Hoogenhuyze*¹⁾ gefolgt sind, ist es noch immer strittig²⁾, ob die Dauerverkürzung des quergestreiften Muskels durch einen eigenen, zur erhöhten Bildung von Kreatin führenden Stoffwechsel aufrecht erhalten wird, wie die genannten Autoren annehmen, oder nicht. Die Schwierigkeit mag zum Teil darin liegen, daß wir noch nicht wissen, wie die Zirkulation bei den verschiedenen Formen von Dauerverkürzung verändert ist und wie dadurch einerseits die Entwicklung und der Abbau des Kreatins im Muskel, andererseits der Abtransport dieser Substanz bzw. des Kreatinins beeinflusst wird. So wird beispielsweise von *Schönfeld*³⁾, der bei hypnosestarren Fröschen an den Adduktoren eine Kreatinvermehrung feststellte, eine Verlangsamung des Kreislaufs in Erwägung gezogen, während *Kahn*⁴⁾ daran denkt, daß die von ihm gefundene Kreatinverminderung der im tonischen Klammerreflex kontrahierten Muskeln auf einer Ausschwemmung des Muskelkreatins durch eine erhöhte Zirkulation beruhe. Aber auch die Untersuchung von Starrezuständen, die sich am ausgeschnittenen Muskel erzielen lassen, konnte keine eindeutige Entscheidung bringen. Denn, wenn beispielsweise *Pekelharing* und *Hoogenhuyze* am wärmestarren und totenstarren Muskel einen erhöhten Kreatingehalt feststellten, so können diese Befunde schon darum nicht als Beweis für einen der

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 262, 1910; 69, 395, 1910.

²⁾ Eine kritische Besprechung des vorliegenden Materials hat der eine von uns (*Spiegel*) in der demnächst erscheinenden „Physiologie und Pathologie des Skelettmuskeltonus“ (Verlag Julius Springer, Berlin) durchzuführen versucht.

³⁾ Pflügers Arch. 191, 211, 1921.

⁴⁾ Ebendasselbst 177, 294, 1919.

intravitalen tonischen Verkürzung zugrunde liegenden Kreatinstoffwechsel angesehen werden, weil bei ihnen auch eine Vermehrung von Milchsäure, also von Endprodukten des Kohlehydratstoffwechsels, stattfindet. Erst wenn sich eine Form der Starre finden lassen würde, bei der Kreatinvermehrung ohne gleichzeitige Milchsäureanhäufung beobachtet würde, könnte die Entwicklung der Starre allein mit der Kreatinproduktion in Zusammenhang gebracht werden.

Nachdem bisher weder die Untersuchungen der verschiedensten Formen von Dauerverkürzung, die am lebenden Tiere erzeugt wurden, noch die Befunde bei postmortal bzw. am ausgeschnittenen Muskel erzeugter Starre zu einem eindeutigen Ergebnis geführt haben, schien es nicht unangebracht, der Frage von einer anderen Seite her näherzukommen. Zunächst muß man sich darüber klar werden, ob eine erhöhte Kreatinproduktion bei allen Formen von Dauerverkürzung möglich ist. Der Mangel einer meßbaren Erhöhung des Energieverbrauchs gegenüber dem Ruhezustand wird ziemlich allgemein als eine charakteristische Eigentümlichkeit der tonischen Verkürzung betrachtet. Wie soll es aber möglich sein, daß es in einem Muskel, der keinen erhöhten Stoffwechsel, keinen erhöhten Sauerstoffverbrauch, keine vermehrte Kohlensäureproduktion aufweist, der nicht mehr Wärme produziert als der ruhende, der sich selbst durch unser feinstes Reagens, die Messung der Aktionsströme, nicht von dem ruhenden Muskel unterscheidet, zur erhöhten Bildung einer Substanz als Endprodukt eines Eiweißzerfalls kommen soll?

Riesser¹⁾ hat diese Schwierigkeit auch wohl erkannt und sucht ihr dadurch zu begegnen, daß er meint, der Mangel eines nachweisbaren Energieumsatzes betreffe die Höhe der tonischen Verkürzung, diese verlaufe als statischer Ruhezustand, die „Tonusschwankung“ dagegen sei mit Energieverbrauch verbunden.

Jene Formen von Dauerverkürzung, bei welchen sich keine Erhöhung des Stoffumsatzes gegenüber der Ruhe nachweisen ließ, bei denen Stromlosigkeit im Muskel besteht, scheiden also von vornherein aus, für sie ist eine Vermehrung von Kreatin durch erhöhte Bildung dieser Substanz gar nicht zu erwarten. Nur für jene Starreformen, bei welchen sich Aktionsströme im Muskel nachweisen lassen, die keinen statischen Ruhezustand darstellen, sondern als eine Summation von Einzelzuckungen aufgefaßt werden müssen, besteht die Möglichkeit einer vermehrten Kreatinbildung; sie können sich von der zur Bewegung führenden Verkürzung des Muskels bloß dadurch unterscheiden, daß die Intensität der einzelnen Stöße geringer ist, oder dadurch, daß die sie zusammensetzenden Einzelzuckungen einen besonders trägen Abfall haben, so daß ein glatter Tetanus schon durch eine geringe Reizfrequenz

¹⁾ Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 80, 183, 1917.

zustande kommt. Daß eine geringere Intensität der einzelnen Stöße eine erhöhte Kreatinbildung zur Folge haben soll, ist wohl nicht anzunehmen. Es bleibt daher nur die Möglichkeit, daß die Verzögerung der Erschlaffung bei der einzelnen Zuckung von einer Kreatinvermehrung begleitet sei. Zur Prüfung dieser Frage wurde der Kreatin-gehalt bei anoxymotischer Zuckung untersucht, da man bei fortgesetzter Reizung des Muskels bei Sauerstoffmangel in noch erhöhtem Maße als bei der Ermüdung unter gewöhnlichen Verhältnissen einen gestreckten Abfall der Einzelzuckung beobachten kann.

Die Reizung erfolgte am Gastrocnemius von Fröschen (*R. temporaria* und *R. esculenta*) mittels Unterbrechung des Primärstromes durch ein Metronom in Intervallen von 2 bis 3 Sekunden durch maximale Öffnungs-induktionsschläge, während die Schließungsschläge abgeblendet waren, und wurde bis zur totalen Erschöpfung des Muskels durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe tauchte der Muskel in 50 ccm Ringerlösung bzw. 50 ccm Ringer- plus drei Tropfen einer 1,3proz. KCN-Lösung. Die zweite Serie bestand in Reizversuchen in Luft bzw. in einer Stickstoffatmosphäre. Der Muskel wurde in einem kleinen Fläschchen suspendiert, das durch einen Gummistöpsel mit dreifacher Bohrung abschließbar war. Bohrung I enthielt ein Glasrohr, welches bis an den Boden des Gefäßes hinabreichte, hier rechtwinklig umgebogen war und nahe dem zugeschmolzenen Ende einen kleinen Glasbügel trug. Knapp oberhalb des Gummistöpsels war durch ein kleines Bohrloch ein Draht in das Innere dieses Glasrohres eingeführt und nahe dem Glasbügel durch ein zweites Bohrloch aus ihm gezogen, um an den Bügel geschlungen zu werden. Beide Bohrlöcher waren nach der Durchführung des Drahtes wieder zugekittet. Schließlich war an der dem Boden des Gefäßes zugekehrten Seite des horizontalen Schenkels nahe dessen Ende eine kleine Öffnung ausgefeilt. Dadurch konnte dieses durch die Bohrung I geführte Glasrohr gleichzeitig zur Zuleitung des Gases für die Versuche in einer Stickstoffatmosphäre, zur Verbindung mit dem einen Pol des Induktionsapparats und zur Fixierung des einen Muskelendes (an dem von dem Draht umschlungenen Glasbügel) dienen. Das zweite Muskelende hing an einem Draht, der durch die Bohrung II hindurch zu einem Muskelhebel führte und von dem außerdem die Verbindung mit dem zweiten Pol des Induktionsapparats hergestellt war. Für die Reizversuche in einer Stickstoffatmosphäre war der Verschluss der Bohrung II durch einen Vaselinepfropf gewährleistet, der die Bewegungen des durchgeführten Drahtes bei Kontraktion des Muskels praktisch nicht hinderte. Bohrung III enthielt schließlich ein knapp unter dem Gummistöpsel endendes Rohr, welches für Versuche in einer Stickstoffatmosphäre als Gasableitungsrohr diente und zur Kontrolle des Durchströmens des Gases mit einem Gummischlauch in Verbindung stand, der unter Wasser endete. [Eine ähnliche Versuchsanordnung findet sich bei Winterstein¹⁾ beschrieben, aber, entsprechend dem Zweck jener Versuche (Untersuchung der Bedingungen der Totenstarre), ohne Einrichtung zur Reizung des Muskels.] Selbstverständlich befand sich der Kontrollmuskel während der Zeit der Reizung in dem gleichen Medium und unter sonst gleichen Bedingungen wie der gereizte.

¹⁾ Pflügers Arch. 191, 184, 1921.

Es wurde das Gesamtkreatinin des Muskels nach der von *Kahn*¹⁾ angegebenen Modifikation der *Folinschen* Methode bestimmt. Kleine Veränderungen dieser Methode erwiesen sich als vorteilhaft, denn die Umwandlung des Kreatins in Kreatinin gelang uns nach der Angabe *Kahns* (Einengung des mit 0,25 ccm 25 proz. HCl angesäuerten Muskel-extrakts durch 3 Stunden auf dem Wasserbade) nicht vollkommen, woran der Wechsel der Säurekonzentration beim fortschreitenden Verdampfen der Flüssigkeit schuld zu tragen schien.

Die Kreatininbestimmung gestaltete sich also, kurz geschildert, folgendermaßen. Der Muskel wurde nach Wägung zerschnitten, mit etwa 2 ccm heißer 5proz. NaCl-Lösung überschüttet, sorgfältig mit einem Pistill zerrieben, der Brei in eine Eprovette überführt, mit insgesamt 3 ccm heißer NaCl-Lösung nachgespült. Nach Ansäuerung mit einem bis zwei Tropfen 10proz. Essigsäure wurde 1½ Minuten gekocht, nach Absedimentieren des Muskelbreies filtriert. Der koagulierte Muskelbrei wurde viermal mit 5 ccm Wasser aufgekocht und jedesmal heiß filtriert. Die gesamte Flüssigkeit wurde nun auf wenige Kubikzentimeter eingeeengt, in eine auf 10 ccm geeichte Eprovette gebracht, mit 1 ccm 22 % HCl versetzt und bis zur Marke aufgefüllt, die Eprovette mit einem am Rande eingekerbten Kork verschlossen und 3½ Stunden auf dem Wasserbade gekocht. Nach Abkühlung, Neutralisation und Einengung der Flüssigkeit auf etwa 1 ccm wurde auf 5 ccm aufgefüllt und weiter nach *Kahns* Vorschrift mit dem *Fleischlschen* Hämometer kolorimetriert. Bei Reizung des Muskels in Ringer bzw. Ringer-Cyan wurde selbstverständlich die Flüssigkeit, in welcher der Muskel suspendiert war, zusammen mit dem dazu gehörigen Muskelextrakt zur Kreatininbestimmung verarbeitet.

Die mittels dieser Methode vom Gastrocnemius von Temporarien und Eskulenten (in den Monaten März bis Juli) erhaltenen Werte schwankten zwischen 3,0 bis 4,4 mg Gesamtkreatinin pro Gramm Muskelsubstanz.

Die Reizversuche in Ringer bzw. in Ringer-Cyan sind in Tabelle I wiedergegeben, Tabelle II enthält die Reizversuche in Luft bzw. in Stickstoff.

Tabelle I. Reizversuche in Ringer und Ringer-Cyan.

	Gewicht		Abgelesener Wert		Gesamt-Kreatiningehalt pro 1 g Muskel	
	gereizt	ungereizt	gereizt	ungereizt	gereizt	ungereizt
1	0,44 g	0,38 g	42	34	4,2 mg	3,7 mg
2	1,036	0,998	75	76	3,7 "	3,8 "
3	0,766	0,738	61	60	3,8 "	3,8 "
4	0,543	0,649	33	40	2,6 "	3,1 "
5	0,72	0,65	40	44	2,7 "	2,9 "
6	1,279	1,071	85	80	3,4 "	3,7 "
7	0,722	0,694	58	57	3,8 "	3,9 "

Versuch 1 bis 3 = Reizversuche in Ringerlösung, 4 bis 7 in Ringer-Cyanlösung.

¹⁾ *Kahn*, l. c.

Tabelle II.

Reizversuche in Luft bzw. Stickstoff.

	Gewicht		Abgelesener Wert		Kreatiningehalt pro 1 g Muskel	
	gereizt	ungereizt	gereizt	ungereizt	gereizt	ungereizt
1	0,460 g	0,475 g	48	43	4,7 mg	4,3 mg
2	0,654	0,665	56	57	3,9 "	3,9 "
3	0,993	0,977	75	73	3,7 "	3,7 "
4	0,937	0,937	75	74	4,0 "	3,9 "
5	1,225	1,264	81	77	3,3 "	3,0 "
6	0,768	0,770	64	65	4,0 "	4,1 "
7	0,833	0,843	69	70	4,0 "	4,0 "
8	0,753	0,731	57	56	3,6 "	3,6 "

Versuch 1 bis 4 = Reizversuche in Luft, 5 bis 8 in Stickstoff.

Auf die Reizversuche in Ringerlösung und in Luft, die nur des Vergleichs halber vorgenommen wurden, erübrigt sich näher einzugehen. Es zeigten sich in Übereinstimmung mit den neueren Angaben der Literatur (Zusammenstellung der diesbezüglichen Literatur bei *V. Scaffidi*, diese Zeitschr. 50, 402, 1913) keine wesentlichen Verschiedenheiten im Kreatiningehalt des ruhenden und des bis zur Erschöpfung gereizten Muskels. Was die Reizversuche in Ringer-Cyan anlangt, so war in keinem Falle eine Vermehrung, einige Male sogar eine deutliche Verminderung des Kreatiningehalts des gereizten Muskels festzustellen. Diese Verminderung dürfte aber darauf zurückzuführen sein, daß der unter anoxybiotischen Verhältnissen zuckende Muskel infolge der stärkeren Milchsäurebildung (vgl. *Meyerhof*) sich stärker mit Wasser imbibiert und daher die pro Gramm Muskelsubstanz berechnete Kreatinmenge zu gering erscheint. Tatsächlich zeigen auch die Reizversuche in Stickstoff, bei welchen die Möglichkeit einer Imbibition des Muskels ausgeschlossen ist, keine Veränderung im Kreatiningehalt des gereizten Muskels gegenüber dem ruhenden, welche jenseits der Versuchsfehler liegen würde.

Wir sehen also, daß es bei der anoxybiotischen Zuckung trotz Verlangsamung der Erschlaffung zu keiner Vermehrung des Muskelkreatins kommt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von *Parnas* und *Wagner*¹⁾, welche bei der Bestimmung des Aminostickstoffs nach *van Slyke* in Muskeln, welche in einer Stickstoffatmosphäre bis zur Ermüdung gereizt worden waren, dieselben Werte wie in normalen ruhenden Froschmuskeln fanden. Diese Werte geben allerdings, wie die Autoren selbst hervorheben, über das Verhalten des Kreatins bei der anoxybiotischen Zuckung keinen Aufschluß, jedenfalls geht aber aus diesen Versuchen hervor, daß eine Abspaltung von Amino-

¹⁾ Diese Zeitschr. 61, 387, 1914.

säuren, Harnstoff, NH_3 , primären Basen während der anoxybiotischen Zuckung nicht stattfindet, daß also auch ein Stoffwechsel, der über die Bildung dieser Substanzen abläuft, für die Verzögerung der Erschlaffung nicht verantwortlich zu machen ist.

Wir müssen darum den verzögerten Abfall der Kontraktion des unter Sauerstoffmangel zuckenden Muskels bloß auf die Steigerung der schon bei der normalen Ermüdung des Muskels zu beobachtenden Milchsäureanhäufung zurückführen, die infolge der mangelnden Verbrennung bzw. oxydativen Synthese der Milchsäure zu ihrer Muttersubstanz [Fletcher und Hopkins¹)] eintritt.

Die anoxybiotische Zuckung zeigt also, daß es zu einer Verlangsamung der Erschlaffung bloß durch Anhäufung von Milchsäure, ohne vermehrte Kreatinproduktion kommen kann. Fälle von Verzögerung der Erschlaffung, welche allein von Kreatinvermehrung ohne gleichzeitige Milchsäureanhäufung begleitet wären, wurden dagegen bisher noch nicht beobachtet. *Wir können daher einen zur Bildung von Kreatin führenden Eiweißstoffwechsel nicht als notwendige Bedingung des verlangsamen Ablaufs von Einzelkontraktionen ansehen und müssen darum für diese ebenso wie für die aus ihnen zusammengesetzten Formen von Dauerverkürzung die Veränderungen im Kohlehydratstoffwechsel als die maßgebende Ursache der Verkürzung betrachten.*

¹) Journ. of Physiol. 35, 247, 1909; 43, 281, 1911.

Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus.

Der Einfluß einiger Chinin- und Harnstoffverbindungen auf die α -Proteasen.

Von

J. A. Smorodinzew und A. N. Adowa.

(Aus der chemotherapeutischen Abteilung des Tropeninstituts Moskau.)

(Eingegangen am 9. September 1922.)

Eine der Grundeigentümlichkeiten der physiologischen und pharmakologischen Wirkungen des Chinins auf den Organismus der höheren Tiere ist die Verzögerung des Stickstoffzerfalls¹⁾. Die Frage aber, wie dieses Alkaloid auf die einzelnen Phasen des Stickstoffwechsels einwirkt, ist bislang in der einschlägigen Literatur fast gar nicht berührt worden. Den Beobachtungen von Fr. T. Gromowa²⁾ nach verzögert eine 0,5proz. Chininhydrochloridlösung die Spaltung des Eiweißes im Hefesaft durch die Endotryptase. Laqueurs³⁾ Versuchen nach verstärken kleine Chinindosen (0,001 bis 0,05 %) den Eiweißzerfall in der Leber, während bei größeren Dosen dieser Prozeß verzögert wird und schließlich ganz aufhört. Was den Einfluß des Chinins auf die Trypsinverdauung der Eiweißstoffe anbetrifft, so sind uns keinerlei Angaben darüber bekannt geworden. Aus diesem Grunde beschlossen wir, vor allem den Einfluß einiger Chininpräparate auf die Verdauung des Caseins durch das Trypsin näher zu untersuchen, da die Tryptasen der Gewebe demselben sehr ähnlich sind. Zu diesem Zweck erscheint Fuld Gross' Methode sehr vorteilhaft.

I. Chininhydrochlorid.

Das Chininhydrochlorid, $C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl + 2 H_2O$ (Molekulargewicht 396,820), ist in der Therapie eins der gebräuchlichsten Präparate dieses Heilmittels. Infolge seiner relativen Leichtlöslichkeit (1 : 34) konnten n/20 Lösungen bereitet werden.

¹⁾ J. A. Smorodinzew, Arb. d. Tropeninst. Moskau (russisch) 1922.

²⁾ T. Gromowa, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 299, 1904.

³⁾ E. Laqueur, Arch. f. exper. Pathol. 55, 240, 1906.

Tabelle I.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probierröschens	Quantität der Trypsineinheiten
	Benennung	Konzentration				
1	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	—	—
2	Wasser	—		(0,25 %)	7	128
3	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{30}$	aus Milch	"	—	—
4	Wasser	—	"	"	7	128
5	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{60}$	Grüblers	"	—	—
6	Wasser	—	"	"	7	128
7	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{200}$	aus Milch	"	5	32
8	"	$\frac{1}{200}$	"	"	5	32
9	Wasser	—	"	"	7	128
10	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	Grüblers	"	5	32
11	"	$\frac{1}{310}$	"	"	5	32
12	Wasser	—	"	"	7	128
13	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{100}$	"	Riedl	1	2
14	"	$\frac{1}{100}$	"	(0,25 %)	—	—
15	Wasser	—	"	"	6	64
16	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	"	5	32
17	"	$\frac{1}{310}$	"	"	3	8
18	Wasser	—	"	"	6	64
19	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	aus Milch	"	5	32
20	"	$\frac{1}{310}$	"	"	4	16
21	Wasser	—	"	"	6	64

Wie Tabelle I zeigt, verzögert dieses Chininpräparat sehr bedeutend die Verdauung des Caseins: bei $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{60}$ und $\frac{1}{100}$ der Normalkonzentration erwiesen sich alle Probierröschchen getrübt, während beim Kontrollversuch nur die letzten, vom siebenten an beginnend, Trübung zeigten.

Einen merklich verzögernden Einfluß üben schon Lösungen dieses Mittels von $\frac{1}{200}$ und $\frac{1}{310}$ der Normalkonzentration aus. Eine derartige Lösung wurde zum Zweck eines Vergleichs des Einflusses des salzsauren und schwefelsauren Chinins in möglichst gleichen Dosen angewandt, da das schwefelsaure Chinin wegen seiner Schwerlöslichkeit nur in $\frac{1}{310}$ der Normalkonzentration untersucht werden kann.

Nachdem somit der verzögernde Einfluß des salzsauren Chinins unzweifelhaft bewiesen war, stellten wir die minimale Konzentration fest, bei der es noch imstande ist, die Verdauung des Caseins zu verzögern.

Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, macht sich dieser Effekt schon bei 0,003 bis 0,015 %, durchschnittlich bei 0,009 % desselben im Medium geltend. Offenbar übt das Chinin seine Wirkung unmittelbar auf das Ferment, nicht aber auf das Substrat aus, da desto mehr Chinin nötig ist, um denselben Effekt hervorzubringen, je stärker die Fermentlösung

Tabelle II.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des ersten durchsichtigen Probierröschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
22	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	8	$\frac{1}{1200}$	0,007
23	Wasser	—	"	(0,25 : 64 %)	durchsicht.	—	—
24	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{20}$	"	"	8	$\frac{1}{1200}$	0,007
25	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
26	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{20}$	"	"	7	$\frac{1}{640}$	0,014
27	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
28	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{300}$	aus Milch	"	6	$\frac{1}{3200}$	0,003
29	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
30	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{200}$	"	"	4	$\frac{1}{800}$	0,011
31	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
32	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	"	5	$\frac{1}{2400}$	0,004
33	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
34	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	"	5	$\frac{1}{2400}$	0,004
35	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
36	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	Grüblers	"	5	$\frac{1}{2400}$	0,004
37	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
38	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	"	4	$\frac{1}{1240}$	0,007
39	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
40	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	Riedl	3	$\frac{1}{620}$	0,015
41	Wasser	—	"	(0,25 : 32 %)	durchsicht.	—	—
42	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	"	3	$\frac{1}{620}$	0,015
43	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
44	Chininhydrochlorid	$\frac{1}{310}$	"	"	3	$\frac{1}{620}$	0,015
45	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—

ist: bei 32facher Verdünnung verzögert eine 0,015proz. Lösung, bei 64facher schon eine 0,003 bis 0,004proz. Außerdem scheint das salzsaure Chinin stärker auf das Köhlersche Präparat, das schwefelsaure auf das Riedlsche einzuwirken (s. Tabelle II und XIX).

II. Die Doppelverbindung des Chininhydrochlorids mit Harnstoff.

Das salzsaure Carbamidchinin, eine Doppelverbindung des salzsauren Chinins mit salzsaurem Harnstoff, $C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl \cdot CO(NH_2)_2 \cdot HCl + 5H_2O$ (Molekulargewicht 547,676), ist ein in Wasser leichtlösliches (1:1) Chininpräparat, welches in 50proz. Lösung zu subkutanen Injektionen empfohlen wird. Für uns bietet es noch deshalb ein Interesse, weil seinerzeit der Harnstoff selbst als Heilmittel bei Malaria angewandt wurde. Diese Verbindung wurde von uns anfänglich in $\frac{1}{20}$ der Normalkonzentration erprobt. Das Resultat war dem oben beschriebenen gerade entgegengesetzt: alle Probierröschchen waren klar und durchsichtig, d. h. also, daß diese Verbindung die Verdauung des Caseins sehr beschleunigt (Tabelle III).

Tabelle III.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durch- sichtigen Probier- gläschens	Quantität der Trypsin- einheiten
	Benennung	Konzentration				
46	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	<i>Grüblers</i>	<i>Riedl</i>	10	üb. 1024
47	Wasser	—	„	(0,25 %)	6	64
48	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	„	„	10	üb. 1024
49	Wasser	—	„	„	6	64
50	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	aus Milch	„	10	üb. 1024
51	Wasser	—	„	„	6	64
52	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	„	„	10	üb. 1024
53	Wasser	—	„	„	6	64
54	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	„	<i>Köhler</i>	10	üb. 1024
55	Wasser	—	„	(0,25 %)	7	128
56	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	„	„	10	üb. 1024
57	Wasser	—	„	„	7	128
58	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	<i>Grüblers</i>	„	10	üb. 1024
59	Wasser	—	„	„	7	128
60	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{30}$	„	„	10	üb. 1024
61	Wasser	—	„	„	7	128

Tabelle IV zeigt, daß dieses Präparat die Trypsinverdauung des Caseins bei einem Gehalt von 0,57 % im Medium (von n/1 bis n/20) beschleunigt, bei geringeren Konzentrationen beginnt es, einen verzögernden Einfluß auszuüben, besonders im vierten und fünften Probiergläschen, wo die Trübung stärker ist als im Kontrollgläschen, das kein Chinin enthält.

Da das fünfte Probiergläschen Carbamidchinin in $\frac{1}{330}$ der Normalkonzentration enthielt und auch zum Vergleich mit der Wirkung des salzsäuren und schwefelsäuren Chinins eine Lösung von $\frac{1}{310}$ Proz. Normalkonzentration nötig war, so wurde eine solche von uns untersucht. Es erwies sich, daß eine solche Lösung des gegebenen Präparats in der Tat die Verdauung des Caseins stark verzögert (Tabelle V), und daß dieser Effekt in Lösungen auftritt, bei denen das Medium 0,005 bis 0,018 %, im Mittel 0,011 % davon enthält (Tabelle VI). 0,0025 bis 0,00008 Proz. Lösungen ($\frac{1}{4000}$ bis $\frac{1}{153720}$) wirken weder beschleunigend noch verzögernd (Tabellen IV und VI). Es muß darauf hingewiesen werden, daß auch in diesem Falle stärkere Lösungen des Ferments zur Erzielung eines gleichen verzögernden Einflusses mehr Chinin er-

fordern und daß dieses wiederum stärker auf das *Köhlersche* als auf das *Riedlsche* Präparat wirkt (Tabelle VI).

Tabelle IV.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Beschleunigende Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	‰
62	Salzs. Carbamidchinin	1/1	Grüblers	Köhler	5	1/10	0,71
63	Wasser	—	"	(0,25:128 ‰)	trüb	—	—
64	Salzs. Carbamidchinin	1/1	"	"	5	1/10	0,71
65	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
66	Salzs. Carbamidchinin	1/1	"	"	5	1/10	0,71
67	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
68	Salzs. Carbamidchinin	1/20	"	"	1	1/20	0,57
69	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
70	Salzs. Carbamidchinin	1/20	"	"	1	1/20	0,57
71	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
72	Salzs. Carbamidchinin	1/20	aus Milch	"	1	1/20	0,57
73	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
74	Salzs. Carbamidchinin	1/20	"	"	1	1/20	0,57
75	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
76	Salzs. Carbamidchinin	1/20	"	Riedl	1	1/20	0,57
77	Wasser	—	"	(0,25:64 ‰)	trüb	—	—
78	Salzs. Carbamidchinin	1/20	"	"	1	1/20	0,57
79	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
80	Salzs. Carbamidchinin	1/20	Grüblers	"	1	1/20	0,57
81	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
82	Salzs. Carbamidchinin	1/20	"	"	1	1/20	0,57
83	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
84	Salzs. Carbamidchinin	1/310	"	Köhler	—	—	—
85	Wasser	—	"	(0,25:128 ‰)	trüb	—	—
86	Salzs. Carbamidchinin	1/310	"	"	—	—	—
87	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
88	Salzs. Carbamidchinin	1/310	"	"	—	—	—
89	Wasser	—	"	"	trüb	—	—

Tabelle V.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Konzentration der Trypsineinheiten
	Benennung	Konzentration				
90	Salzs. Carbamidchinin	1/310	Grüblers	Köhler	—	—
91	Wasser	—	"	(0,25 ‰)	7	128
92	Salzs. Carbamidchinin	1/310	"	"	—	—
93	Wasser	—	"	"	7	128
94	Salzs. Carbamidchinin	1/310	aus Milch	"	—	—
95	Wasser	—	"	"	7	128
96	Salzs. Carbamidchinin	1/310	"	"	—	—
97	Wasser	—	"	"	7	128

Tabelle VI.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentrations des Trypsins	Nummer des ersten durch- sichtigen Probier- gläschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentrations				Mol.	%
98	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{310}$	aus Milch	<i>Köhler</i>	5	$\frac{1}{2480}$	0,005
99	Wasser	—	"	(0,25 : 64 %)	durchsicht.	—	—
100	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{310}$	"	"	5	$\frac{1}{2480}$	0,005
101	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
102	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{310}$	<i>Grüblers</i>	(0,25 : 32 %)	3	$\frac{1}{820}$	0,018
103	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
104	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{310}$	"	"	4	$\frac{1}{1240}$	0,009
105	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
106	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{310}$	"	<i>Riedl</i>	4	$\frac{1}{1240}$	0,009
107	Wasser	—	"	(0,25 : 32 %)	durchsicht.	—	—
108	Salzs. Carbamidchinin	$\frac{1}{310}$	"	"	3	$\frac{1}{820}$	0,018
109	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—

III. Der Harnstoff und dessen Salze.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die Doppelverbindung Carbamidchinin in ihrer Lösung in Chinin und Harnstoff zerfällt, und daß jeder dieser Stoffe selbständig und voneinander unabhängig wirken muß. Um die Überzeugung zu gewinnen, daß die beschleunigende Wirkung dieses Doppelsalzes des Chinins gerade vom Harnstoff abhängt, sahen wir uns genötigt, die Wirkung des freien Harnstoffs und seiner Salze auf diesen Prozeß näher zu untersuchen.

Die Versuche zeigten uns, daß eine n/20 Lösung des freien Harnstoffs den Prozeß auf keine Weise beeinflusst (Tabellen VII und VIII).

Tabelle VII.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentrations des Trypsins	Nummer des letzten durch- sichtigen Probier- gläschens	Konzentrations der Trypsin- einheiten
	Benennung	Konzentrations				
110	Harnstoff	$\frac{1}{20}$	aus Milch	<i>Köhler</i>	7	128
111	Wasser	—	"	(0,25 %)	7	128
112	Harnstoff	$\frac{1}{20}$	"	"	7	128
113	Wasser	—	"	"	7	128
114	Harnstoff	$\frac{1}{20}$	<i>Grüblers</i>	"	7	128
115	Wasser	—	"	"	7	128

Tabelle VIII.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des ersten durchsichtigen Probiergläschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
116	Harnstoff	$\frac{1}{20}$	aus Miloh	Köhler	1	—	—
117	Wasser	—	„	(0,25 : 64 %)	durchsicht.	—	—
118	Harnstoff	$\frac{1}{20}$	„	„	1	—	—
119	Wasser	—	„	„	durchsicht.	—	—

Dagegen beschleunigt salzsaures, schwefelsaures und salpetersaures Carbamid in $\frac{1}{20}$ Konzentration die Trypsinverdauung des Caseins stark (Tabellen IX und XI).

Tabelle IX.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Konzentration der Trypsin-einheiten
	Benennung	Konzentration				
120	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	10	üb. 1024
121	Wasser	—	„	(0,25 %)	7	128
123	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	„	„	10	üb. 1024
124	Wasser	—	„	„	7	128
125	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	aus Milch	„	10	üb. 1024
126	Wasser	—	„	„	7	128
127	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	„	„	10	üb. 1024
128	Wasser	—	„	„	7	128
129	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{210}$	Grüblers	„	—	—
130	Wasser	—	„	„	7	128
131	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{210}$	„	„	—	—
132	Wasser	—	„	„	7	128
133	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	„	Riedl	10	üb. 1024
134	Wasser	—	„	(0,25 %)	6	64
135	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	„	„	10	üb. 1024
136	Wasser	—	„	„	6	64
137	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	aus Milch	„	10	üb. 1024
138	Wasser	—	„	„	6	64
139	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{20}$	„	„	10	üb. 1024
140	Wasser	—	„	„	6	64
141	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{210}$	Grüblers	„	—	—
142	Wasser	—	„	„	6	64
143	Carbamidechlorid . .	$\frac{1}{210}$	„	„	—	—
144	Wasser	—	„	„	6	64

Tabelle X.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentrations- des Trypsins	Nummer des letzten durch- sichtigen Probier- gläschens	Konzentrations- der Trypsin- einheiten
	Benennung	Konzentrations- tration				
145	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	10	üb. 1024
146	Wasser	—	"	(0,25 ‰)	7	128
147	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	10	üb. 1024
148	Wasser	—	"	"	7	128
149	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{510}$	"	"	—	—
150	Wasser	—	"	"	7	128
151	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{510}$	"	"	—	—
152	Wasser	—	"	"	7	128

Tabelle XI.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentrations- des Trypsins	Nummer des letzten durch- sichtigen Probier- gläschens	Konzentrations- der Trypsin- einheiten
	Benennung	Konzentrations- tration				
153	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	10	üb. 1024
154	Wasser	—	"	(0,25 ‰)	7	128
155	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	10	üb. 1024
156	Wasser	—	"	"	7	128
157	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{310}$	"	"	—	—
158	Wasser	—	"	"	7	128
159	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{310}$	"	"	—	—
160	Wasser	—	"	"	7	128

Der beschleunigende Einfluß der Carbamidsalze macht sich in $\frac{1}{20}$ bis $\frac{1}{160}$ der Normalkonzentration (Tabellen XII, XIII und XIV) bei einem Gehalt an 0,12 bis 0,02 % davon im Medium geltend; $\frac{1}{310}$ der Normallösung der Carbamidsalze zeigen eine verzögernde Wirkung auf die Verdauung des Caseins, wobei sich dieselbe in den Grenzen von $\frac{1}{180}$ bis $\frac{1}{2458}$ der Normallösung bei einem Gehalt von 0,015 bis 0,001 % davon im Medium (Tabellen XV, XVI und XVII) kundgibt.

Tabelle XII.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentrations- des Trypsins	Nummer des letzten durch- sichtigen Probier- gläschens	Beschleunigende Konzentration	
	Benennung	Konzentrations- tration				Mol.	‰
161	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	3	$\frac{1}{80}$	0,03
162	Wasser	—	"	(0,25 : 128 ‰)	trüb	—	—
163	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	3	$\frac{1}{80}$	0,03
164	Wasser	—	"	"	trüb	—	—

Tabelle XII (Fortsetzung).

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Beschleunigende Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
165	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	aus Milch	Köhler	3	$\frac{1}{80}$	0,03
166	Wasser	—	"	(0,25 : 128 ‰)	trüb	—	—
167	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	3	$\frac{1}{80}$	0,03
168	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
169	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	"	Riedl	3	$\frac{1}{80}$	0,03
170	Wasser	—	"	(0,25 : 128 ‰)	trüb	—	—
171	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	3	$\frac{1}{80}$	0,03
172	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
173	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	(0,25 : 64 ‰)	3	$\frac{1}{80}$	0,03
174	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
175	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	3	$\frac{1}{80}$	0,03
176	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
177	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{310}$	"	Köhler	—	—	—
178	Wasser	—	"	(0,25 : 128 ‰)	trüb	—	—
179	Carbamidchlorid . . .	$\frac{1}{310}$	"	"	—	—	—
180	Wasser	—	"	"	trüb	—	—

Tabelle XIII.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Beschleunigende Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
181	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	4	$\frac{1}{160}$	0,019
182	Wasser	—	"	(0,25 : 128 ‰)	trüb	—	—
183	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	4	$\frac{1}{160}$	0,019
184	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
185	Carbamidnitrat . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	4	$\frac{1}{160}$	0,019
186	Wasser	—	"	"	trüb	—	—

Tabelle XIV.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Beschleunigende Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
187	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{20}$	Grüblers	Köhler	3	$\frac{1}{80}$	0,034
188	Wasser	—	"	(0,25 : 128 ‰)	trüb	—	—
189	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	3	$\frac{1}{80}$	0,034
190	Wasser	—	"	"	trüb	—	—
191	Carbamidsulfat . . .	$\frac{1}{20}$	"	"	3	$\frac{1}{80}$	0,034
192	Wasser	—	"	"	trüb	—	—

Tabelle XV.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des ersten durchsichtigen Probiergläschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
193	Carbamidchlorid	1/20	Grüblers	Köhler (0,25 : 64 %)	1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 durchsichtig	1/320 bis 1/1280	0,007—0,002
194	Wasser	—	"	"	"	"	—
195	Carbamidchlorid	1/20	"	"	1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 durchsichtig	1/320 bis 1/1280	0,007—0,002
196	Wasser	—	"	"	"	"	—
197	Carbamidchlorid	1/20	"	Riedl (0,25 : 32 %)	1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 durchsichtig	1/160 bis 1/640	0,015—0,004
198	Wasser	—	"	"	"	"	—
199	Carbamidchlorid	1/20	"	"	1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 durchsichtig	1/160 bis 1/640	0,015—0,004
200	Wasser	—	"	"	"	"	—
201	Carbamidchlorid	1/310	"	"	3 durchsichtig	1/620	0,004
202	Wasser	—	"	"	"	—	—
203	Carbamidchlorid	1/310	"	"	3 durchsichtig	1/620	0,004
204	Wasser	—	"	"	"	—	—
205	Carbamidchlorid	1/310	aus Milch	"	4 durchsichtig	1/1240	0,002
206	Wasser	—	"	"	"	—	—
207	Carbamidchlorid	1/310	"	"	4 durchsichtig	1/1240	0,002
208	Wasser	—	"	"	"	—	—
209	Carbamidchlorid	1/310	"	Köhler (0,25 : 64 %)	5 durchsichtig	1/2480	0,001
210	Wasser	—	"	"	"	—	—
211	Carbamidchlorid	1/310	"	"	5 durchsichtig	1/2480	0,001
212	Wasser	—	"	"	"	—	—
213	Carbamidchlorid	1/310	Grüblers	"	4 durchsichtig	1/1240	0,002
214	Wasser	—	"	"	"	—	—
215	Carbamidchlorid	1/310	"	"	5 durchsichtig	1/2480	0,002
216	Wasser	—	"	"	"	—	—

Tabelle XVI.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des ersten durchsichtigen Probiergläschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
217	Carbamidnitrat	1/30	<i>Grüblers</i>	<i>Köhler</i> (0,25 : 64 %)	1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 durchsichtig	1/320 bis 1/1280	0,009 bis 0,0024
218	Wasser	—	"	"	"	—	—
219	Carbamidnitrat	1/20	"	"	1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 durchsichtig	1/320 bis 1/1280	0,009 bis 0,0024
220	Wasser	—	"	"	"	—	—
221	Carbamidnitrat	1/20	"	<i>Riell</i>	1, 2, 3, 6, 7, 8 durchsichtig	1/160 bis 1/320	0,019 bis 0,009
222	Wasser	—	"	(0,25 : 32 %)	"	—	—
223	Carbamidnitrat	1/20	"	"	1, 2, 3, 6, 7, 8 durchsichtig	1/160 bis 1/320	0,019 bis 0,009
224	Wasser	—	"	"	"	—	—
225	Carbamidnitrat	1/310	"	<i>Köhler</i>	4 durchsichtig	1/1240	0,0025
226	Wasser	—	"	(0,25 : 64 %)	"	—	—
227	Carbamidnitrat	310	"	"	4 durchsichtig	1/1240	0,0025
228	Wasser	—	"	"	"	—	—
229	Carbamidnitrat	310	"	"	4 durchsichtig	1/1240	0,0025
230	Wasser	—	"	"	"	—	—

Tabelle XVII.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des ersten durchsichtigen Probiergläschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
231	Carbaminsulfat	1/20	<i>Grüblers</i>	<i>Köhler</i> (0,25 : 64 %)	1, 2, 3, 8, 9, 10 durchsichtig	1/160 bis 1/1280	0,017 bis 0,002
232	Wasser	—	"	"	"	—	—
233	Carbaminsulfat	1/20	"	"	1, 2, 3, 8, 9, 10 durchsichtig	1/160 bis 1/1280	0,017 bis 0,002
234	Wasser	—	"	"	"	—	—
235	Carbaminsulfat	1/20	"	"	1, 2, 3, 8, 9, 10 durchsichtig	1/160 bis 1/1280	0,017 bis 0,002
236	Wasser	—	"	"	"	—	—
237	Carbaminsulfat	1/310	"	"	3 durchsichtig	1/620	0,004
238	Wasser	—	"	"	"	—	—
239	Carbaminsulfat	1/310	"	"	3 durchsichtig	1/620	0,004
240	Wasser	—	"	"	"	—	—
241	Carbaminsulfat	1/310	"	"	3 durchsichtig	1/620	0,004
242	Wasser	—	"	"	"	—	—
243	Carbaminsulfat	1/310	"	"	4 durchsichtig	1/1240	0,002

Ein Vergleich der Konzentrationen, bei denen eine Verzögerung des vorliegenden Prozesses unter dem Einfluß des salzsauren Chinins (0,009 %), des salzsauren Carbamids (0,002 %) und ihrer Doppelverbindung (0,011 %) stattfindet, zeigt, daß der Effekt dieser letzteren sozusagen eine Summierung der Wirkungen der einzelnen Komponenten vorstellt. Gleicherweise mäßigt die beschleunigende Wirkung des Carbamids in seiner Doppelverbindung mit dem Chinin die verzögernde Wirkung dieses letzteren.

Der elektroneutrale Körper — der Harnstoff —, der auf das Trypsin keinerlei Wirkung ausübt, gewinnt im ionisierten Zustande seiner Salze die Fähigkeit, den Verlauf des fermentativen Prozesses zu ändern, woraus man schließen kann, daß die Elektrolyte einen wesentlichen Einfluß auch auf die Arbeit der Fermente ausüben.

IV. Das Chininsulfat.

Das Chininsulfat, $(C_{20}H_{24}N_2O_2)_2H_2SO_4 + 8H_2O$, (Molekulargewicht 890,88) wurde von uns zum Zweck der Entscheidung der Frage untersucht, ob der Einfluß der Chininpräparate bloß von der Base selbst oder von beiden Komponenten derselben abhängt.

In Anbetracht der Schwerlöslichkeit (1:788) dieses Präparats konnten wir nur n/310 Lösungen benutzen. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Chininsulfat die Arbeit des Trypsins verzögert und schädlicher auf das *Riedlsche* als auf das *Köhlersche* Präparat einwirkt, im Mittel bei 0,009 %, wie auch das Chininhydrochlorid und bei derselben Konzentration, bei welcher diese Substanz die vitalen Funktionen der Infusorien lähmt.

Tabelle XVIII.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des letzten durchsichtigen Probiergläschens	Konzentration der Trypsineinheiten
	Benennung	Konzentration				
245	Chininsulfat	1/310	Grüblers	Köhler	6	64
246	Wasser	—	„	(0,25 %)	7	128
247	Chininsulfat	1/310	„	„	6	64
248	Wasser	—	„	„	7	128
249	Chininsulfat	1/310	aus Milch	„	6	64
250	Wasser	—	„	„	7	128
251	Chininsulfat	1/310	„	„	6	64
252	Wasser	—	„	„	7	128
253	Chininsulfat	1/310	Grüblers	Riedl	1	2
254	Wasser	—	„	(0,12 %)	5	32
255	Chininsulfat	1/310	„	(0,25 %)	5	32
256	Wasser	—	„	„	6	64
257	Chininsulfat	1/310	„	„	5	32
258	Wasser	—	„	„	6	64

Tabelle XIX.

Nr.	Reagens		Casein	Konzentration des Trypsins	Nummer des ersten durch- sichtigen Probier- gläschens	Verzögernde Konzentration	
	Benennung	Konzentration				Mol.	%
259	Chininsulfat	$\frac{1}{310}$	Grüblers	Köhler	3	$\frac{1}{620}$	0,015
260	Wasser	—	"	(0,25 : 64 %)	durchsicht.	—	—
261	Chininsulfat	$\frac{1}{310}$	"	"	3	$\frac{1}{620}$	0,015
262	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
263	Chininsulfat	$\frac{1}{310}$	aus Milch	"	3	$\frac{1}{620}$	0,015
264	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
265	Chininsulfat	$\frac{1}{310}$	Grüblers	Riedl	6	$\frac{1}{4960}$	0,002
266	Wasser	—	"	(0,25 : 32 %)	durchsicht.	—	—
267	Chininsulfat	$\frac{1}{310}$	"	"	6	$\frac{1}{4960}$	0,002
268	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—
269	Chininsulfat	$\frac{1}{310}$	"	"	6	$\frac{1}{4960}$	0,002
270	Wasser	—	"	"	durchsicht.	—	—

Schlüsse.

1. Das salzsaure Chinin verzögert die Wirkung des Trypsins.
2. Die Verdauung des Caseins kommt schon bei einem Gehalt von 0,009 % an Chininhydrochlorid im Medium zum Stillstand.
3. Eine n/20 bis n/80 Lösung des salzsauren Carbamids beschleunigt die Trypsinverdauung des Caseins.
4. Eine n/160 bis n/2480 Lösung dieses Präparats bei einem Gehalt an 0,015 bis 0,001 % im Medium verzögert diesen Prozeß.
5. Unter n/2480 der Lösung übt bei einem Gehalt an 0,0005 bis 0,00016 % das Carbamidchlorid weder eine verzögernde noch eine beschleunigende Wirkung aus.
6. Eine n/20 bis n/160 Lösung des Carbamidnitrats beschleunigt die Trypsinverdauung des Caseins.
7. Eine n/160 bis n/1280 Lösung des Carbamidnitrats verzögert bei einem 0,019 bis 0,0024proz. Gehalt desselben im Medium diesen Prozeß.
8. Eine n/20 bis n/80 Lösung des Carbamidsulfats beschleunigt die Trypsinverdauung des Caseins.
9. Eine n/160 bis n/1280 Lösung des Carbamidsulfats verzögert diesen Prozeß bei einem Gehalt an 0,017 bis 0,002 % davon im Medium.
10. Eine n/20 Lösung des freien Harnstoffs übt auf das Trypsin keinen Einfluß aus.
11. Eine n/1 bis n/20 Lösung des Carbamidchinins beschleunigt die Arbeit des Trypsins bei einem Gehalt von 11,44 bis 0,57 %.
12. Eine n/310 bis n/2480 Lösung dieses Präparats lähmt die Trypsinverdauung bei 0,11proz. Gehalt.

13. Der beschleunigende Einfluß des Carbamidchinins hängt von der Gegenwart vom Carbamidhydrochlorid in dessen Molekül ab.

14. Der beschleunigende Einfluß der Carbamidchininverbindung ist geringer als derjenige des Carbamidhydrochlorids, da der verzögernde Einfluß des Chininhydrochlorids hemmend entgegenwirkt.

15. Die Minimalkonzentration, bei welcher der verzögernde Einfluß einer Carbamidchininlösung sich bemerkbar macht, ist gleich 0,011 % und stellt gleichsam die Summe der verzögernden Wirkung des Chininhydrochlorids und des Carbamidhydrochlorids vor.

16. Das Chininsulfat verzögert die Wirkung des Trypsins auf das Casein.

17. Der verzögernde Einfluß des Chininsulfats tritt schon bei einem Gehalt an 0,009 % davon im Medium zutage.

18. Im salzsauren und schwefelsauren Chinin wird der verzögernde Einfluß auf das Trypsin durch das Chinin selbst bedingt, da er nicht vom Anion abhängt.

19. Das Chininhydrochlorid verzögert die Wirkung des Trypsins stärker bei dem *Köhlerschen*, das Chininsulfat bei dem *Riedlschen* Caseinpräparat.

20. Stärkere Fermentlösungen fordern mehr Chinin oder Carbamid, damit der verzögernde Effekt zur Geltung kommt.

21. Der elektroneutrale Körper — der Harnstoff —, verhält sich indifferent, gewinnt aber, wenn er in den ionisierten Zustand übergeführt ist (Salz), die Fähigkeit, den Verlauf des fermentativen Prozesses zu verändern.

**Die Entstehung der Peroxydase in den Pflanzen.
Die Bedingungen, welche die Abspaltung der Peroxydase von den
Protoplasten und ihr Übergang in den Zellsaft hervorrufen.**

Von

W. Palladin † und Frl. S. Manskaja.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der russischen Akademie
der Wissenschaften.)

(Eingegangen am 12. Oktober 1922.)

Die Frage nach der Entstehung der Oxydationsfermente in den Pflanzen ist bis heute noch offen. Nach der Analogie mit den übrigen Fermenten muß man denken, daß sie in den Protoplasten entstehen. Jetzt werden die Oxydationsfermente der Pflanzen aus dem Zellsaft gewonnen. In den Tiergeweben aber sind die Oxydationsfermente gewöhnlich mit den Protoplasten verbundene intrazelluläre Fermente. Nur auf Grund einer nicht großen Zahl von mikroskopischen Untersuchungen darf man denken, daß auch in den Pflanzen die Oxydationsfermente nicht ausschließlich sich im Zellsaft befinden, sondern auch als mit den Protoplasten verbundene intrazelluläre Fermente erscheinen. Darum entsteht die Frage, in welcher gegenseitigen Beziehung die Oxydationsfermente des Zellsaftes zu den mit den Protoplasten verbundenen Oxydationsfermenten stehen. Es entsteht ferner die Frage, ob sie nicht anfänglich als Zymogene entstehen. So geben *Woods*¹⁾ und *Aso*²⁾ das Bestehen besonderer Zymogene der Oxydationsfermente im Zellsaft zu, die dabei dauerhafter als die Fermente selbst sind. Nach der Meinung von *Jamada* und *Jodlbauer*³⁾ und auch *Bach*⁴⁾ wird das Zymogen der Peroxydase vom Licht oder Jod aktiviert. In den gereinigten Präparaten der Peroxydase fehlt das Zymogen. Man darf nicht vergessen, daß die Existenz der Zymogene (Profermente) noch nicht als vollkommen erwiesen angesehen werden kann. So behauptete *Duclaux*⁵⁾, daß die Versuche, auf Grund deren man das

¹⁾ *Woods*, U. S. Depart. of Agriculture 18, 17.

²⁾ *Aso*, Bull. Col. Agric. Tokyo 5, 2, 226.

³⁾ *Jamada* und *Jodlbauer*, diese Zeitschr. 8, 61, 1908.

⁴⁾ *Bach*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 40, 230, 1906; 41, 225, 1908.

⁵⁾ *Duclaux*, Traité de microbiologie 2, 340, 1899.

Bestehen der Zymogene anerkennt, anders erklärt werden können. Zwecks Lösung dieser Frage ist von uns vorliegende Arbeit ausgeführt worden. Für die quantitativen Bestimmungen der Peroxydase benutzten wir die von *Lubimenko*¹⁾ ausgearbeitete kolorimetrische Methode; es wird die Intensität der Färbung einer Guajakharzlösung durch eine Lösung der Peroxydase mit Hinzufügung von H_2O_2 mit der Lösung von Bleu de Coton (0,05 g auf 200 ccm Wasser) verglichen. In einem Teil unserer Versuche benutzten wir Cyanin mit minimaler Zugabe von Methylenblau. Aber diese Mischung ist nach der Färbung weniger brauchbar als Bleu de Coton. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

1. Die Verteilung der Peroxydase in den verschiedenen Teilen der Pflanzenzellen.

Die Oxydationsprozesse in den Zellen wurden zum erstenmal genau von *Pfeffer*²⁾ erforscht. Er sah sie hauptsächlich als postmortale Erscheinung an. *Grüss*³⁾ in seiner ersten Arbeit sah als den Stoff, der das Guajakharz blau färbt, die Diastase an. *Raciborsky*⁴⁾ fand in den Siebröhren, in den Milchgefäßen und in den verschiedenen Parenchymzellen eine das Guajakharz im Vorhandensein von H_2O_2 blaufärbende Substanz. Diese Substanz wurde von ihm *Leptomin* genannt. Wie *Grüss*' Diastase, so auch *Raciborskys* Leptomin waren in Wirklichkeit Peroxydase. In seinen späteren Arbeiten fand *Grüss*⁵⁾ die Peroxydase im Phloem in jungem Holz. *Clarke*⁶⁾ erforschte die Verteilung der Peroxydase in den verschiedenen Teilen der Blumenblätter. *Keeble* und *Armstrong*⁷⁾ fanden, daß in den Blumenblättern sich zwei Peroxydasen befinden. Die eine befindet sich in der Epidermis und in den anliegenden Zellen und wird durch Benzidin mit H_2O_2 braun gefärbt, α -Naphthol und H_2O_2 färben sie nicht. Die andere Peroxydase befindet sich im Xylem der Leitbündel. Diese Peroxydase wird durch Benzidin braun gefärbt und durch α -Naphthol violettblau. Vielleicht hängt das verschiedene Verhältnis zu den Reagenzien nicht von der Verschiedenheit der Peroxydase ab, sondern von dem verschiedenen Medium, d. h. von dem verschiedenen chemischen Bestandteil der Epidermis und der inneren Zellen. Wie in dieser, so auch in den späteren

1) *Lubimenko*, Mémoires de l'Académie des sciences de Petrograd Phys. Math. 88, Nr. 12, 1916.

2) *Pfeffer*, Ber. d. botan. Ges. 3, 82, 1889.

3) *Grüss*, ebendasselbst 1895.

4) *Raciborsky*, ebendasselbst 1898, S. 52, 119.

5) *Grüss*, ebendasselbst 1898, S. 129; Beitr. z. Enzymol. Festschrift für *Schwendener*, S. 184. Berlin 1899.

6) *Clarke*, *Forreya* 11, 31, 84, 101, 1911.

7) *Keeble* and *Armstrong*, Proc. of the Roy. Soc. 85, 214, 1912.

Arbeiten setzten sich *Keeble*, *Armstrong* und *Jones*¹⁾, ebenso *Jones*²⁾ zum Ziel, das Verhältnis zwischen der Verteilung der Peroxydase und der Verteilung der Chromogene festzustellen. Dasselbe Ziel verfolgten *Atkins*³⁾, wie auch *Reed*⁴⁾ und *Bunzel*⁵⁾. Die Frage, in welchen Teilen der Zelle die Peroxydase sich befinde, interessierte sie nicht. Darum, um die Frage von der Verteilung der Peroxydase in den verschiedenen Teilen der Zelle zu lösen, sind von uns die folgenden Versuche ausgeführt worden.

Versuch 1.

Das Häutchen von der Innenfläche der Zwiebelschuppen einer gewöhnlichen Zwiebel. Als Reaktiv für die Peroxydase diente eine gesättigte Lösung von Guajakol. Zu 5 ccm einer Guajakollösung wurden zehn Tropfen von 3proz. H_2O_2 hinzugefügt. Stückchen von dem Häutchen wurden in diese Lösung gelegt. Das Protoplasma und der Zellkern färbten sich hellbraun. Der Zellsaft war schwächer gefärbt. Das in Wasser gekochte Häutchen hat eine kaum sichtbare Färbung. Stückchen des Häutchens, nachdem sie durch Alkohol bearbeitet wurden, ließen sich nicht färben. Um die Frage zu lösen, ob auch die Zellhaut sich färbe, wurde das Häutchen erst der Plasmolyse (10 % Kalisalpeter) unterworfen und darauf mit Guajakol und H_2O_2 bearbeitet. Das abgelöste Protoplasma färbte sich gut, die gefärbten Plasmodesmen waren sichtbar. Die Zellhäute jedoch blieben farblos. Um die Voraussetzung zu beseitigen, daß in den beschriebenen Fällen das Protoplasma nicht darum von Guajakol sich färben ließ, weil in ihm die Peroxydase sich befand, sondern weil in dem Protoplasma zwei Lösungen sich begegneten — eine von außen (Guajakol) und die andere von innen (Zellsaft mit Peroxydase) und in dem Protoplasma eine gefärbte Niederschlagsmembran bildeten, wurden die Stückchen des Häutchens der Autolyse unterworfen.

Zu diesem Zweck wurden sie für 24 Stunden in von Chloroform gesättigtes Wasser gelegt, darauf in Wasser durchgewaschen und dann wieder in Chloroformwasser gelegt. Nach einer solchen Bearbeitung war natürlich der Zellsaft mit der in ihm enthaltenen Peroxydase entfernt. Wie das Protoplasma, so auch die Zellkerne ließen sich nach einer zweitägigen Autolyse von Guajakol färben, wenn auch viel schwächer. Diese schwächere Färbung wird folgendermaßen erklärt: während der Autolyse, wie wir später sehen werden, geht ein Teil der mit dem Protoplasma verbundenen Peroxydase in die Lösung über. Aus diesem Versuch folgt, daß in dem Häutchen der Zwiebel die Peroxydase sich hauptsächlich in Verbindung mit dem Protoplasma und dem Zellkern befindet. Das Ausfallen der Reaktion mit Guajakol nach dem Bearbeiten des Häutchens mit Alkohol läßt die Voraussetzung aufkommen, daß der Alkohol entweder das zur Reaktion nötige Ferment entfernt oder die Verbindung von Eiweiß mit der Per-

¹⁾ *Keeble*, *Armstrong* and *Jones*, Proc. of the Roy. Soc. 86, 308, 1913.

²⁾ *Jones*, ebendasselbst S. 318.

³⁾ *Atkins*, Sci. Proc. R. Soc. Dublin N. 14, 144, 157, 317, 1913; zitiert nach *Wheldale*, The anthocyanin pigments of plants. Cambridge.

⁴⁾ *Reed*, Botanical Gazette 57, 528, 1914.

⁵⁾ *Bunzel*, Journ. Agric. Research 2, 373, 1914. Wir wissen nicht, ob derartige Arbeiten in den letzten Jahren erschienen sind.

oxydase gerinnen läßt. In dem Häutchen von keimenden Zwiebeln wird das Protoplasma von Guajakol und H_2O_2 intensiver gefärbt, als in dem Häutchen von nicht keimenden Zwiebeln.

Versuch 2.

Trockene Samen von Bohnen (*Vicia Faba*). Das Protoplasma der Keimlinge und der Cotyledonen gibt eine starke Reaktion durch Guajakol mit H_2O_2 . Die Zellhäute farblos.

Bei den Bohnensamen, die 24 Stunden in Wasser gelegen haben, wird das Protoplasma der Keimlinge eine starke Reaktion auf die Peroxydase geben, das Protoplasma der Cotyledonen eine schwächere.

Versuch 3.

Keimende Bohnensamen. Nach der Plasmolyse der Schnitte durch die Wurzel gibt der von den Zellhäuten abgetrennte Protoplast eine sehr starke Reaktion auf die Peroxydase, die Zellhäute farblos. Auf Schnitten durch Stengel und Wurzeln färben sich die Zellkerne intensiver als das Protoplasma, besonders intensiv färben sich die Kernkörperchen. Das Protoplasma der Stengelquerschnitte hat ein rosenkranzartiges Aussehen — dünne Stellen wechseln mit kugelförmigen Verdickungen.

Auf Schnitten durch Stengel und Wurzeln, die einer vorbereitenden zweitägigen Autolyse unterworfen wurden, gibt das Protoplasma eine sehr starke Reaktion mit Guajakol und H_2O_2 . Die Zellkerne sind nicht sichtbar. Auf Wurzelquerschnitten, die einer monatlichen Autolyse unterworfen wurden, gaben die Protoplaste eine sehr starke Reaktion auf die Peroxydase. Auf Schnitten durch Wurzel und Stengel, welche 24 Stunden in Methylspiritus gelegen, geben Protoplasma und Zellkerne die Reaktion mit Guajakol und H_2O_2 , aber eine schwächere, mit Pyrocatechin dagegen geben solche Schnitte eine stärkere Reaktion als frische. In beiden Fällen sind die Zellkerne gefärbt, aber bei frischen Schnitten sind die Kernkörperchen braun, bei Schnitten jedoch, die mit Methylspiritus bearbeitet wurden, sind die Kernkörperchen farblos. Bei Schnitten durch Stengel und Wurzeln, welche 20 Tage in Methylspiritus gelegen, bleibt die Reaktion mit Guajakol und mit Guajakharz aus.

Legt man junge Triebe von Bohnen in eine Lösung von Guajakharz mit H_2O_2 , so bekommt man sehr schöne Präparate. Die Keimlinge färben sich intensiv dunkelblau, die Samenhälften schwach hellblau. Dieselbe, nur etwas geschwächte Färbung wird bei Trieben nach einer monatlichen Autolyse in mehrmals gewechseltem Chloroformwasser beobachtet. Eben- solche Präparate bekam *Palladin*¹⁾ früher beim Bearbeiten von Trieben erst mit Chloreisen und dann essigsaurom Natrium beim Studium der Atmungschromogene. Bei einer solchen Bearbeitung bekommt man ebenfalls dunkelblaue Keimlinge und hellblaue Cotyledonen. Folglich ist in den Keimlingen sehr viel Peroxydase sowie auch Atmungschromogene, in den Cotyledonen dagegen wenig von dem einen und anderen.

Versuch 4.

Auf Schnitten durch Körner von Weizen geben die Zellen der Aleuron- schicht eine intensive Reaktion auf die Peroxydase. Der von Weizenmehl

¹⁾ *W. Palladin*, Atmungschromogene der Pflanzen. Ber. d. Taurischen Universität. Nr. 2, 1919.

reingewaschene Kleber gibt eine verhältnismäßig schwache Reaktion mit Guajakol und Guajakharz, eine starke Reaktion mit Hydrochinon und H_2O_2 , eine sehr starke Reaktion mit Pyrocatechin und Pyrogallol.

Versuch 5.

Ziel dieses Versuchs war das Erklären des Verhältnisses der Zellhüllen zu der Reaktion auf die Peroxydase. Wie schon früher erwähnt wurde, geben Hüllen von reiner Zellmembran keine Reaktion auf die Peroxydase.

Alle erforschten verholzten Hüllen geben mehr oder weniger intensive Reaktionen auf die Peroxydase. Offenbar verlieren Stücke von Holzfasern, wenn sie trocken aufbewahrt werden, allmählich das Vermögen, Reaktionen auf die Peroxydase zu geben. Auf Querschnitten durch einen jungen Pappelzweig (*Populus boleana*), am 28. Februar abgeschnitten, färbten sich die Holzfasern sehr stark, ebenso von Guajakol wie auch von Guajakharz, wenn H_2O_2 hinzugefügt war. Ebensolche Reaktionen gaben die Holzfasern auf Querschnitten durch einen jungen, am selben Datum abgeschnittenen Eichenzweig. Bei Querschnitten durch ein Cliviablatt gab Cuticula gute Reaktionen auf die Peroxydase. Auf Querschnitten durch Wurzeln von Iris gibt außer der Holzfaser auch die Endodermis eine Reaktion auf die Peroxydase. Die dünnen Außenhüllen im Dezember ausgegrabener Wurzeln färben sich bedeutend intensiver als die dicken hufeisenförmigen Hüllen. Sehr intensiv färbt sich der Inhalt der Leitzellen. Das Vermögen, Reaktionen auf die Peroxydase zu geben, bleibt auch dem Spiritusmaterial erhalten. Bei Anfang März ausgegrabenen Wurzeln ist eine intensivere Färbung der dünnen Außenhüllen kaum bemerkbar. Auf Querschnitten durch Parenchym, der Rinde der Wurzel (Alkoholmaterial), sieht man, daß die mittleren Platten sich bedeutend intensiver färben als die Innenschichten. Die Plasmodemen sind zu sehen.

Auf Grund der beschriebenen Untersuchungen folgt:

1. Außer der freien Peroxydase, die sich im Zellsaft befindet, befindet sich in den Pflanzen noch eine Peroxydase, die mit verschiedenen Teilen des Protoplasts verbunden ist.
2. Das Protoplasma und der Zellkern der im Wachstum wie auch in Ruhe sich befindenden Organe geben farbige Reaktionen auf die Peroxydase, wie in den lebenden plasmolysierten, so auch in einer ziemlich langen Autolyse unterworfenen Zellen.
3. Nach einer längeren Wirkung von Spiritus wird das Vermögen, Reaktionen auf die Peroxydase zu geben, geschwächt und verschwindet schließlich ganz.
4. Bei Weizenkeimlingen gibt die Aleuronschicht sehr intensive Reaktionen auf die Peroxydase.
5. Der aus Weizenmehl gewonnene Kleber gewährt ebenfalls alle Reaktionen auf die Peroxydase.
6. Hüllen von reiner Zellmembran enthalten keine Peroxydase.
7. Verholzte Hüllen, Cuticula und Endodermis der Wurzeln von Iris gewähren gute Reaktionen auf die Peroxydase.

II. Die Bildung der freien Peroxydase während der Autolyse. Die Bedeutung der Salze für die Autolyse.

Die im vorigen Kapitel beschriebenen Versuche haben gezeigt, daß in den Pflanzen außer der freien Peroxydase des Zellsaftes sich noch eine mit den verschiedenen Elementen des Protoplasts verbundene Peroxydase befindet. Es entsteht die Frage, ob die gebundene Peroxydase während des Zerfalls der Elemente des Protoplasts oder während seiner Autolyse in die Lösung übergehen könne.

Die Versuche der Autolyse der Tier- und Pflanzenorgane werden gewöhnlich so veranstaltet, daß die Organe zerkleinert werden, mit von Chloroform gesättigtem Wasser begossen und mehrere Tage stehen gelassen. Eine solche Autolyse ist für uns kaum annehmbar, da wir beim Zerkleinern der Pflanze zusammen mit der gebundenen Peroxydase auch die Peroxydase des Zellsaftes einführen. Wir mußten vorher die ganze freie Peroxydase entfernen. Um diesen Zweck zu erreichen, wurde das zerkleinerte Organ sorgfältig ausgedrückt, in Wasser durchgewaschen, wieder ausgedrückt, und dann erst wurde die ausgedrückte Masse der vorbereitenden Autolyse unterworfen. Die vorbereitende Autolyse wurde angewandt, weil die Sicherheit fehlte, daß trotz dem sorgfältigen Zerkleinern alle Zellen getötet waren und folglich ihren Zellsaft verloren hatten. Darum wurde die ausgedrückte Masse mit Chloroformwasser verdünnt und 24 Stunden lang stehen gelassen. Darauf wurde das Wasser ausgedrückt, wieder mit Chloroform gesättigtes Wasser hinzugefügt und die Autolyse dauerte noch 24 Stunden. Dann wurde das Wasser wieder ausgedrückt und erst nach solchen vorbereitenden Autolysen wurde die ausgedrückte Masse dann der endgültigen Autolyse unterworfen, um die Frage zu lösen, ob die gebundene Peroxydase in die Lösung übergehe. Bei einem solchen Verfahren blieb in der ausgedrückten Masse auch keine Spur von Zellsaft, folglich keine Spur freier Peroxydase. Das Entfernen des Zellsaftes hatte noch den Vorteil, daß auf solch eine Art und Weise erstens das Mittel entfernt wurde, das unbedingt Einfluß auf den Gang der Autolyse hatte, und zweitens konnte man den Gang der Autolyse in destilliertem Wasser oder in verschiedenen Lösungen verfolgen. Diese Methode nennen wir „Autolyse nach vorbereitender Autolyse“. Ein Protoplast besteht aus Kolloiden. Eine Reihe von Forschern haben gezeigt, daß verschiedene Salze, ebenso wie Säuren und Basen verschiedenen Einfluß auf das Gerinnen und Quellen der Kolloide¹⁾ haben. Für unsere Zwecke haben darum besonderes Interesse die Resultate der Forschungen über hämolytische Wirkung der Salze. Wenn man die

¹⁾ *M. N. Fisher, Oedema. A Study of the Physiology and the Pathology of the Water Absorption by living Organism, 1910.*

Erythrocyten irgend eines Tieres in Lösungen verschiedener Salze gleichen osmotischen Druckes legt, so tritt nach einiger Zeit das Hämoglobin aus den Erythrocyten, aber nicht gleichzeitig in allen Lösungen. Die Erythrocyten lösen sich zuerst (am schnellsten) in Chlorkalium auf, dann in der Lösung von Chlor-Rubidium und Cäsium, schließlich in NaCl und Lithium chloratum. Folglich verstärkt sich die hämolytische Wirkung der Kationen in der Reihe: $\text{Li, Na} < \text{Cs} < \text{Rb} < \text{K}$. Eine ebensolche Reihe ist für die Anione festgesetzt: $\text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{Br} < \text{NO}_3 < \text{J}$. Da die Autolyse mit Hilfe von Fermenten vor sich geht, so muß man im Auge behalten, daß vieles auf den Einfluß der Salze, auf die Arbeit der Fermente hinweist¹⁾. Dabei erweist es sich, daß das Salz, welches die Arbeit eines Ferments in einem Objekt stimuliert, gar keinen Einfluß auf die Arbeit desselben Ferments in einem anderen Objekt hat. So bewies Frl. Gromoff²⁾ eine stark stimulierende Wirkung von KNO_3 auf das proteolytische Ferment von Zymin. Zalesky konnte eine Wirkung desselben Salzes auf das proteolytische Ferment der Samen nicht feststellen. Levitzky³⁾ bekräftigte die Aussagen von Gromoff betreffs Zymin, fand aber, daß KNO_3 keinen Einfluß auf das proteolytische Ferment von Weizenkeimlingen ausübt. Das Studium des Einflusses der Salze auf die Autolyse (Hämolyse, Cytolyse) ist noch von einem Standpunkt aus interessant, dem man bis jetzt keine Achtung geschenkt hat. Es ist bekannt, daß manche Metalle und Metalloide Bestandteile verschiedener Teile des Protoplasts sind. Man kann versuchen, aus dem Bestand des Protoplasts das eine oder andere Metall oder Metalloid zu entfernen, indem man auf das Protoplast mit dem entsprechenden Salz einwirkt. Von diesem Standpunkt ausgehend, haben wir einige Versuche der Autolyse in Anwesenheit oxalsauren und zitronensauren Ammoniaks gemacht, um das Calcium aus dem Protoplast zu entfernen. Als Grund zu diesen Versuchen dienten uns alte Versuche über das Gerinnen des Blutes. Es ist bekannt, daß das Blut die Fähigkeit, zu gerinnen, nach dem Entfernen von Ca durch oxalsaures Ammonium verliert. Außerdem haben die neuesten Forschungen von Delezenne und Fournau⁴⁾ eine erstaunliche Beweglichkeit von Ca-Verbindungen im tierischen Organismus gezeigt. Sie fanden, daß in einem Hühnerei sehr wenig Calcium enthalten ist. Das für das werdende Küchlein während der Inkubationsperiode nötige Calcium wird aus der Schale gewonnen, welche somit der Vorrat an

¹⁾ F. Samuely, Handb. d. Biochem. 1, 528, 1908; Dornby, diese Zeitschr. 81, 107, 1917.

²⁾ Grigorjew und Gromoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 299, 1904.

³⁾ Palladin, Alexandroff, Iwanoff und Levitzky, Bull. d. Akad. d. Wissensch. 1912, S. 677.

⁴⁾ Delezenne et Fournau, Ann. d. l'Institut Pasteur 82, 413, 1918.

Calcium für das zukünftige Kuchlein ist. So befindet sich durchschnittlich in 100 g Stoff von Hühnereiern (ohne Schale) 0,0624 g Calciumoxyd, am 16. Tag der Bebrütung 0,1155 g und am 21. Tag 0,3400 g.

Bevor wir zum Beschreiben der Versuche übergehen, einige Worte über die Termini, wie Autolyse, Cytolyse, Hämolyse. Während der Autolyse werden hauptsächlich die Produkte des Zerfalls der Vorratsstoffe gebildet, aber zur selben Zeit zerfällt auch der Stoff der Protoplaste. Darum ist der Begriff „Autolyse“ ein mehr allgemeiner Begriff, dem die Cytolyse als Einzelfall untergeordnet ist. In unseren Versuchen hatten wir es mit diesem Einzelfall — dem Zerfall der Protoplaste —, d. h. der Cytolyse, zu tun. Man darf nicht vergessen, daß die Umgebung oft verschieden die Autolyse der Vorratsstoffe und die Cytolyse beeinflusst. So fanden *Bradley* und *Taylor*¹⁾, daß die Galle eine starke cytolytische und eine schwache autolytische Wirkung besitzt.

Versuch 6.

Grüne und sich rötende Tomaten. Nach Entfernen des Innern mit den Samen wurden sie in einer Fleischhackmaschine zerkleinert, in einem Mörser zerrieben, gut vermengt und in zwei Teile geteilt.

I. Teil. Vorbereitende Autolyse in Wasser mit Chloroform im Laufe von 24 Stunden. Darauf wurde die Masse ausgedrückt, in Wasser durchgewaschen, wieder ausgedrückt und in sechs Portionen zu je 9 g geteilt. Cytolyse jeder Portion in 50 ccm Flüssigkeit mit Chloroform im Laufe von 10 Tagen. In den ausgedrückten und filtrierten Lösungen wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden²⁾:

1. Wasser	100
2. n/10 Lösung NaCl	260
3. n/10 „ KJ	430
4. n/10 „ von oxalsaurem Ammonium	2100
5. n/20 „ „ „ und n/20 Lösung KJ	1300
6. Gesättigte Lösung von Taka-diasatase mit Citronensäure (Spuren)	325

II. Teil. Vorbereitende Autolyse in gesättigter Lösung von oxalsaurem Ammonium mit Chloroform im Laufe von 24 Stunden. Darauf wird die Masse ausgedrückt, in Wasser durchgewaschen, wieder ausgedrückt und in vier Portionen zu je 9 g geteilt. Die Cytolyse jeder Portion in 50 ccm Flüssigkeit mit Chloroform im Laufe von 11 Tagen. In den filtrierten und ausgedrückten Lösungen wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	100
2. n/10 Lösung NaCl	125
3. n/10 „ KJ	830
4. Gesättigte Lösung von Taka-diasatase mit Citronensäure (Spuren).	100

¹⁾ *Bradley* and *Taylor*, Journ. of biol. Chem. 29, 281, 1917.

²⁾ Die Quantität der Peroxydase nach Cytolyse auf destilliertem Wasser wird in allen Versuchen = 100 gesetzt.

Die ausgedrückten, von den beiden Teilen des Versuchs gebliebenen Massen (gleiche Quantitäten) wurden mit gleichen Mengen von Wasserlösung von Guajakol und mit zehn Tropfen 3proz. H_2O_2 begossen. Aus der Intensität der erhaltenen Färbung konnte man schließen, daß im zweiten Teile bedeutend weniger gebundene Peroxydase geblieben war als im ersten. Außerdem waren die Intensitäten der erhaltenen Färbungen fast negativ im Vergleich zu den Intensitäten der Färbungen der mit Guajakharz erhaltenen Lösungen.

Versuch 7.

Rote Tomaten. Jede Tomate wird in vier Teile zerschnitten, die Samen werden nicht entfernt. Es wurden vier Portionen zu je 80 g genommen, so, daß auf jede Portion ein Viertel von jeder Tomate kam. Drei Portionen wurden mit dem entsprechenden Salz zerrieben, nach der ungefähren Berechnung, daß alle Lösungen normal seien. Zu der vierten Portion wurde nichts hinzugefügt. Nach siebentägiger Autolyse wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Ohne Salz	100
2. NaCl	90
3. NH_4Cl	71
4. Oxalsaures Ammonium	166

Folglich hielten die starken Lösungen von NaCl, NH_4Cl die Autolyse auf¹⁾.

1. Die Quantität der Peroxydase auf die Lösung KNO_3 wurde = 100 gesetzt.
2. Oxalsaures Ammonium löste sich nicht ganz auf.

Versuch 8.

Grüne Tomaten, ohne die innere Masse, werden zerrieben, ausgedrückt. Nach vorbereitender zweitägiger Autolyse wurde die Masse wieder ausgedrückt. Es wurden zwei Portionen zu 7,5 g mit 50 ccm Flüssigkeit genommen. Nach fünftägiger Cytolyse wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	100
2. n-Lösung Saccharose	36

Folglich wird die Bildung der freien Peroxydase in normaler Saccharoselösung stark gehemmt.

Versuch 9.

Etiolierte Bohnenblätter Fünf Portionen zu je 4 g. Jede Portion mit 50 ccm Flüssigkeit verrieben. Vier Portionen wurden einer zweitägigen Autolyse unterworfen; darauf die Lösungen filtriert. Die Lösungen waren mehr oder weniger schwarz. Nach zehnmaligem Verdünnen mit Wasser wurde der Gehalt der Peroxydase in ihnen festgestellt.

1. Wasser	100
2. n/10 Lösung NaCl	420
3. n/10 „ von oxalsaurem Ammonium	1700
4. n/1 „ „ Saccharose	170

¹⁾ Die stimulierende Wirkung einer gesättigten Lösung von oxalsaurem Ammonium ist aber sehr unbedeutend.

5. Die Blätter der fünften Portion wurden mit 50 ccm Wasser verrieben und die Lösung sofort filtriert, die darin enthaltene Peroxydase = 200.

Nachdem die Lösung mit Chloroform 24 Stunden gestanden hatte, wurde sie schwarz und die Quantität der Peroxydase darin geringer = 170. Frisch ausgedrückter Saft rief Blauwerden von Guajakharz hervor ohne Hinzufügen von H_2O_2 . Die Verringerung der Quantität der Peroxydase im Saft der fünften Portion nach zweitägigem Stehen wird durch den Verbrauch für das Oxydieren der Chromogene erklärt. In der ersten Portion nach zweitägiger Autolyse wurde die Quantität der Peroxydase noch geringer, weil während der Autolyse der Blätter die Quantität der Chromogene größer wurde. Darum, um sie zu oxydieren, entstand ein energischer Verbrauch der Peroxydase. Die Autolyse in Gegenwart von Saccharose, wie *Palladin* gezeigt, hemmt die Bildung der Chromogene. Darum war in der Saccharoseportion mehr Peroxydase enthalten als in der Wasserportion. Dezinormale Lösung von Chlornatrium und besonders von oxalsaurem Ammonium förderte stark die Cytolyse der Protoplaste und das Aufspeichern freier Peroxydase.

Versuch 10.

Etiolierte Bohnenstengel ohne Spitzen. Die ausgedrückte Masse wurde nach 24stündiger vorbereitender Autolyse der Cytolyse in verschiedenen Lösungen unterworfen. Nach 17 Tagen wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	0 ¹⁾
2. n/10 Lösung NH_4Cl	100
3. n/10 „ KCl	212
4. n/10 „ von oxalsaurem Ammonium . . .	8500
5. n/10 „ „ zitronensaurem Ammonium .	8500

Folglich wirkt oxalsaures Ammonium ebenso wie zitronensaures Ammonium.

Versuch 11.

Wurzeln der Petersilie (21. November) zerrieben und ausgedrückt, die ausgedrückte Masse in drei Teile geteilt zu je 100 g. Zu jeder Portion wurden 100 ccm Flüssigkeit hinzugefügt, nach 14 Tagen wurden in den Flüssigkeiten folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	100
2. n/10 Lösung von oxalsaurem Ammonium . . .	0

Folglich hat während der Cytolyse der Wurzeln der Petersilie das oxalsaurer Ammonium die Quantität der Peroxydase in der Lösung nicht nur nicht vergrößert, sondern sogar ihre Bildung gehemmt. Ein zweiter Versuch mit Petersilie hatte dieselben Resultate.

Versuch 12.

Wurzeln der Mohrrübe (18. Dezember) wurden zerrieben, die gewonnene Masse in drei Portionen zu 130 g geteilt und zu jeder Portion

¹⁾ Peroxydase in geringer Quantität war auch in der Wasserportion enthalten, aber in zehnmal verdünnter Lösung konnte sie nicht nachgewiesen werden.

130 g Flüssigkeit hinzugefügt. Nach 13 Tagen waren in den Flüssigkeiten folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden worden:

1. Wasser	100
2. n/1 Lösung von Saccharose	78
3. n/5 „ „ oxalsaurem Ammonium	550

Versuch 13.

Saft grüner Tomaten in zwei Portionen geteilt. In einer Portion Pulver von oxalsaurem Ammonium in der zum Erhalten der n/10 Lösung nötigen Quantität hinzugefügt. Darauf wurden beide Säfte einer sofortigen Analyse unterworfen, folgende Quantitäten der Peroxydase wurden gefunden:

1. Saft	100
2. Saft mit oxalsaurem Ammonium	80

Folglich stimuliert oxalsaures Ammoniak die Oxydationsfähigkeit der Peroxydase nicht, sondern hemmt sie sogar. Darum kann das sehr starke Vergrößern des Oxydationsvermögens nach der Autolyse mit oxalsaurem Ammoniak oder zitronensaurem Ammoniak nur durch die verstärkte Abspaltung der Peroxydase von den Protoplasten erklärt werden infolge des Entfernens von Ca aus ihnen.

Versuch 14.

Saft aus den Wurzeln der Mohrrübe (18. Dezember) wurde in vier Portionen geteilt. Eine (Kontroll-) Portion wurde der Analyse sofort unterworfen, zu den anderen wurde Chloroform hinzugefügt und außerdem zur dritten Portion KCl-Pulver und zur vierten oxalsaures Ammoniak in zum Erhalten einer n/10 Lösung genügender Quantität. Nach 13 Tagen wurden drei Portionen der Analyse unterworfen.

1. Kontrollsaft	100
2. Saft ¹⁾	340
3. Saft + KCl	340
4. Saft + oxalsaures Ammoniak	Spuren
5. Saft der vierten Portion durch Citronensäure angesäuert	95
6. Saft der zweiten Portion nach dem Hinzufügen von oxalsaurem Ammoniak	160

Wenn man die Resultate der letzten Versuche mit den Resultaten der Autolysen in Anwesenheit von oxalsaurem Ammonium vergleicht, so sieht man, daß oxalsaures Ammonium zweierlei Wirkung ausübt: 1. fördert die Abspaltung der freien Peroxydase von den Protoplasten, 2. hemmt die Oxydationsarbeit der Peroxydase. Von dem bei der gegebenen Pflanze bei der Autolyse in seiner Gegenwart dominierenden Prozesse hängt bald das Steigen, bald das Fallen der Oxydationsenergie ab.

¹⁾ Folglich besitzt der Saft, der mehrere Tage mit Chloroform gestanden hat, eine größere Oxydationskraft als frischer Saft. Dieses Faktum erklären Woods, Aso, Jamada und Jodlbauer und Bach ebenfalls durch die Bildung der Peroxydase aus dem Zymogen, Lubimenko durch das Abtöten der Antioxydase durch Chloroform. Möglich ist noch eine dritte Erklärung: während der Autolyse bleibt der Saft — die Quantität von Protoplasma — unveränderlich, bloß das Medium wird für die Oxydationsprozesse günstiger. Diese Frage bedarf einer weiteren Bearbeitung.

Versuch 15.

Am 21. April wurden bei einem Aufenthalt in Simferopol junge Stengel mit Blättern von *Aquilegia vulgaris* genommen, in der Fleischhackmaschine zerkleinert, ausgedrückt. Die gewonnene Masse im Laufe von 5 Stunden mit Chloroformwasser autolysiert und dann wieder ausgedrückt und in sieben Portionen zu je 12 g geteilt. Jede Portion wurde 6 Tage lang in entsprechender Lösung autolysiert. In den filtrierten Flüssigkeiten wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	0
2. n/16 Lösung KCl.	100
3. n/8 „ „	131
4. n/4 „ „	131
5. n/2 „ „	131
6. n/1 „ „	144
7. 2 n- „ „	177

Versuch 16.

Saft grüner Tomaten wurde in zwei Portionen geteilt. Zu einer Portion wurde oxalsaures Ammonium (Pulver) in zum Bekommen einer n/10 Lösung genügender Quantität hinzugefügt. Beide Säfte wurden sofortiger Analyse unterworfen. Folgende Quantitäten von Peroxydasen wurden gefunden:

1. Saft	100
2. Saft + oxalsaures Ammonium	80

Versuch 17.

Saft aus den Wurzeln der Mohrrübe (18. Dezember) wurde in vier Portionen geteilt. Eine (Kontroll-) Portion wurde sofortiger Analyse unterworfen, zu den anderen Chloroform und außerdem zur dritten Portion KCl-Pulver und zur vierten oxalsaures Ammonium in zum Bekommen einer n/10 Lösung genügender Quantität hinzugefügt. Nach 13 Tagen wurden drei Portionen der Analyse unterworfen.

	Quantität d. Peroxydase
1. Kontrollsaft	100
2. Saft	340
3. Saft + KCl	340
4. Saft + oxalsaures Ammonium	Spuren
5. Saft der vierten Portion nach dem Ansäuern durch Essigsäure	95
6. Saft der zweiten Portion, nachdem oxalsaures Ammonium hinzugefügt war	160

Wenn man die Resultate der beiden letzten Versuche mit den Resultaten der Autolysen in Gegenwart von oxalsaurem Ammonium vergleicht, so sieht man, daß oxalsaures Ammonium zweierlei Wirkung hat: 1. es fördert das Abepalten der freien Peroxydase von den Protoplasten, 2. es hält die Oxydationsarbeit der Peroxydase auf. In Abhängigkeit davon, welcher Prozeß bei der betreffenden Pflanze während der Autolyse in seiner Gegenwart vorherrscht, erhalten wir das Steigen oder Fallen der Oxydationsenergie.

130 g Flüssigkeit hinzugefügt. Nach 13 Tagen waren in den Flüssigkeiten folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden worden:

1. Wasser	100
2. n/1 Lösung von Saccharose	78
3. n/5 „ „ oxalsaurem Ammonium	550

Versuch 13.

Saft grüner Tomaten in zwei Portionen geteilt. In einer Portion Pulver von oxalsaurem Ammonium in der zum Erhalten der n/10 Lösung nötigen Quantität hinzugefügt. Darauf wurden beide Säfte einer sofortigen Analyse unterworfen, folgende Quantitäten der Peroxydase wurden gefunden:

1. Saft	100
2. Saft mit oxalsaurem Ammonium	80

Folglich stimuliert oxalsaures Ammoniak die Oxydationsfähigkeit der Peroxydase nicht, sondern hemmt sie sogar. Darum kann das sehr starke Vergrößern des Oxydationsvermögens nach der Autolyse mit oxalsaurem Ammoniak oder zitronensaurem Ammoniak nur durch die verstärkte Abspaltung der Peroxydase von den Protoplasten erklärt werden infolge des Entfernens von Ca aus ihnen.

Versuch 14.

Saft aus den Wurzeln der Mohrrübe (18. Dezember) wurde in vier Portionen geteilt. Eine (Kontroll-) Portion wurde der Analyse sofort unterworfen, zu den anderen wurde Chloroform hinzugefügt und außerdem zur dritten Portion KCl-Pulver und zur vierten oxalsaures Ammoniak in zum Erhalten einer n/10 Lösung genügender Quantität. Nach 13 Tagen wurden drei Portionen der Analyse unterworfen.

1. Kontrollsaft	100
2. Saft ¹⁾	340
3. Saft + KCl	340
4. Saft + oxalsaures Ammoniak	Spuren
5. Saft der vierten Portion durch Citronensäure angesäuert	95
6. Saft der zweiten Portion nach dem Hinzufügen von oxalsaurem Ammoniak	160

Wenn man die Resultate der letzten Versuche mit den Resultaten der Autolysen in Anwesenheit von oxalsaurem Ammonium vergleicht, so sieht man, daß oxalsaures Ammonium zweierlei Wirkung ausübt: 1. fördert die Abspaltung der freien Peroxydase von den Protoplasten, 2. hemmt die Oxydationsarbeit der Peroxydase. Von dem bei der gegebenen Pflanze bei der Autolyse in seiner Gegenwart dominierenden Prozesse hängt bald das Steigen, bald das Fallen der Oxydationsenergie ab.

¹⁾ Folglich besitzt der Saft, der mehrere Tage mit Chloroform gestanden hat, eine größere Oxydationskraft als frischer Saft. Dieses Faktum erklären Woods, Aso, Jamada und Jodlbauer und Bach ebenfalls durch die Bildung der Peroxydase aus dem Zymogen, Lubimenko durch das Abtöten der Antioxydase durch Chloroform. Möglich ist noch eine dritte Erklärung: während der Autolyse bleibt der Saft — die Quantität von Protoplasma — unveränderlich, bloß das Medium wird für die Oxydationsprozesse günstiger. Diese Frage bedarf einer weiteren Bearbeitung.

Versuch 15.

Am 21. April wurden bei einem Aufenthalt in Simferopol junge Stengel mit Blättern von *Aquilegia vulgaris* genommen, in der Fleischhackmaschine zerkleinert, ausgedrückt. Die gewonnene Masse im Laufe von 5 Stunden mit Chloroformwasser autolysiert und dann wieder ausgedrückt und in sieben Portionen zu je 12 g geteilt. Jede Portion wurde 6 Tage lang in entsprechender Lösung autolysiert. In den filtrierte Flüssigkeiten wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	0
2. n/16 Lösung KCl.	100
3. n/8 „ „	131
4. n/4 „ „	131
5. n/2 „ „	131
6. n/1 „ „	144
7. 2 n- „ „	177

Versuch 16.

Saft grüner Tomaten wurde in zwei Portionen geteilt. Zu einer Portion wurde oxalsaures Ammonium (Pulver) in zum Bekommen einer n/10 Lösung genügender Quantität hinzugefügt. Beide Säfte wurden sofortiger Analyse unterworfen. Folgende Quantitäten von Peroxydasen wurden gefunden:

1. Saft	100
2. Saft + oxalsaures Ammonium	80

Versuch 17.

Saft aus den Wurzeln der Mohrrübe (18. Dezember) wurde in vier Portionen geteilt. Eine (Kontroll-) Portion wurde sofortiger Analyse unterworfen, zu den anderen Chloroform und außerdem zur dritten Portion KCl-Pulver und zur vierten oxalsaures Ammonium in zum Bekommen einer n/10 Lösung genügender Quantität hinzugefügt. Nach 13 Tagen wurden drei Portionen der Analyse unterworfen.

	Quantität d. Peroxydase
1. Kontrollsaft	100
2. Saft	340
3. Saft + KCl	340
4. Saft + oxalsaures Ammonium	Spuren
5. Saft der vierten Portion nach dem Ansäuern durch Essigsäure	95
6. Saft der zweiten Portion, nachdem oxalsaures Ammonium hinzugefügt war	160

Wenn man die Resultate der beiden letzten Versuche mit den Resultaten der Autolysen in Gegenwart von oxalsaurem Ammonium vergleicht, so sieht man, daß oxalsaures Ammonium zweierlei Wirkung hat: 1. es fördert das Abspalten der freien Peroxydase von den Protoplasten, 2. es hält die Oxydationsarbeit der Peroxydase auf. In Abhängigkeit davon, welcher Prozeß bei der betreffenden Pflanze während der Autolyse in seiner Gegenwart vorherrscht, erhalten wir das Steigen oder Fallen der Oxydationsenergie.

Versuch 18.

Am 18. März genommenes Fleisch des Kürbis (ohne Hülle und Samen) wurde in der Fleischhackmaschine zerkleinert, abgepreßt, die erhaltene Masse einer fünfstündigen Autolyse unterworfen, wieder abgepreßt, in sechs Portionen zu je 35 g geteilt. Jede Portion wurde mit 100 ccm von Chloroform gesättigter Flüssigkeit begossen und einer siebentägigen Autolyse unterworfen. In den filtrierten Flüssigkeiten wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	100
2. n/4 Lösung KCl	104
3. n/2 „ „	133
4. n/1 „ „	184
5. 2n- „ „	218
6. n/10 „ von oxalsaurem Ammonium .	218

Versuch 19.

Am 21. April (in *Simferopol*) wurden junge Stengel mit Blättern der *Aquilegia vulgaris* genommen, in der Fleischhackmaschine zerkleinert, abgepreßt, die erhaltene Masse in Chloroformwasser während 5 Stunden autolysiert, wieder abgepreßt und in sieben Portionen zu je 12 g geteilt. Jede Portion wurde während 6 Tagen in entsprechender Lösung autolysiert. In den filtrierten Flüssigkeiten wurden folgende Quantitäten der Peroxydase gefunden:

1. Wasser	0
2. n/10 Lösung KCl.	100
3. n/8 „ „	131
4. n/4 „ „	131
5. n/2 „ „	131
6. n/1 „ „	144
7. 2n- „ „	177

Die beiden letzten Versuche zeigen, daß beim Verstärken der Konzentration der Lösung von KCl von n/16 bis 2n die Quantität der von den Protoplasten abgespaltenen Peroxydase während der Autolyse in diesen Lösungen steigt.

Auf Grund der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche folgt:

1. Während der Autolyse der Pflanzen spaltet sich von den Protoplasten die mit ihnen verbundene Peroxydase ab.

2. In Gegenwart von Salzen ist das Abspalten bedeutend energischer.

3. Verschiedene Salze wirken verschieden. Die autolytische Wirkung steigt allmählich in der Reihe: $\text{NH}_4\text{Cl} < \text{NaCl} < \text{KNO}_3 < \text{KJ} < \text{zitronensaures Ammoniak, oxalsaures Ammoniak}$.

4. Oxalsaures (und zitronensaures) Ammoniak bewirkt nicht bei allen Pflanzen ein starkes Abspalten der Peroxydase während der Autolyse. Nur bei wenigen Pflanzen fördert das Entfernen von Ca das Abspalten der Peroxydase.

5. Die Konzentration der Salze hat bedeutenden Einfluß auf das Abspalten der Peroxydase während der Autolyse.

6. Takadiastase (enthält ein proteolytisches Ferment) fördert das Abspalten der Peroxydase während der Autolyse.

7. Während der Autolyse an chromogenreichen Pflanzen (etiolierte Bohnenblätter) vermindert sich die Quantität der Peroxydase, da sie für die Oxydation der Chromogene gebraucht wird.

8. Eine Normallösung von Saccharose hält das Abspalten der Peroxydase während der Autolyse auf. Bei chromogenreichen Pflanzen hält eine Normallösung von Saccharose die Bildung der Chromogene während der Autolyse auf und schützt dadurch die Peroxydase vor der Oxydation der Chromogene.

Alle beschriebenen Versuche führen zu dem Schluß, daß wir für die Fermente die Seitenkettentheorie von *Ehrlich* annehmen müssen. Diese Seitenketten sind Bindeglieder zwischen der Zelle und der Außenwelt und heißen nach *Ehrlich* Rezeptoren. Fermente sind solche Rezeptoren. Fermente entstehen ebenso wie die anderen Rezeptoren in den Protoplasten, können in den Zellsaft ausgeschieden werden und wahrscheinlich aus dem Zellsaft entfernt werden und in Verbindung mit den Protoplasten treten.

Die Existenz der mit den Protoplasten verbundenen Fermente diene als Grund der Theorie von der fermentativen Wirkung des Protoplasmas. Diese Theorie muß aufgegeben werden.

Die Lehre von den Profermenten muß auch durchgesehen werden. Schon *Duclaux* hat gezeigt, daß alle Tatsachen, auf Grund deren die Lehre von den Profermenten entstanden ist, anders erklärt werden können.

Auf Grund der ausgeführten Versuche sind einige Vermutungen entstanden, welche durch weitere Untersuchungen gelöst werden müssen. Fermente sind Kolloide und müßten darum nicht durch die Zellmembran durchdringen. Wie sorgfältig die Pflanzen vor der Autolyse auch zerrieben werden, so werden doch die meisten Zellhäute nicht zerrissen. Darum müßte aus solchen Zellen die Peroxydase nicht heraustreten. Aber wir sehen, daß nach der weiteren Autolyse von Pflanzen, die vorher autolysiert und abgepreßt wurden, im neuen Filtrat viel Peroxydase enthalten ist. Dieser Umstand kann verschieden erklärt werden. Erstens ist es möglich, daß die Peroxydase durch die Poren, welche der Verbindung des Protoplasmas einer Zelle mit dem Protoplasma einer anderen dienen, durchdringt. Zweitens, ob nicht bei der Autolyse in Salzlösungen die Salze das unmittelbare Durchdringen der Kolloide durch die Häute fördern. Endlich ist eine dritte Möglichkeit nicht ausgeschlossen: in einigen Fällen fördern die Salze nicht nur das Abspalten der Peroxydase, sondern vergrößern auch ihre

Oxydationsfähigkeit, indem sie das Medium verändern. Obwohl dieser letzte Umstand von uns beachtet worden ist, so ist er doch nicht genügend untersucht worden. Ebenso haben wir einstweilen die Frage offen gelassen, ob eine Antioxydase existiert, oder ob die Versuche von *Lubimenko* anders erklärt werden können.

III. Über die Peroxydase in Holzfasern.

Im ersten Teil wurde darauf hingewiesen, daß verholzte, kutikularisierte Hüllen die Reaktion auf die Peroxydase geben. Zu einer genaueren Erforschung dieser Frage sind von uns folgende Versuche ausgeführt worden.

Versuch 20.

Am 3. März wurden Hobelspäne von einem feuchten Buchenscheit genommen; fünf Portionen zu je 16 g wurden 7 Tage lang in 100 ccm von verschiedenen Flüssigkeiten, (zur ersten bis vierten Portion wurde Chloroform hinzugefügt) autolysiert.

	Quantität d. Peroxydase
1. Wasser	100
2. n/10 Lösung von oxalsaurem Ammonium	85
3. In Wasser gekocht	Spuren
4. In n/10 Lösungen von oxalsaurem Ammonium gekocht	0
5. Methylalkohol	0

Der Methylalkohol wurde dann abfiltriert und die Späne noch 2 Tage in Chloroformwasser autolysiert. Es wurde keine Peroxydase gefunden. Methylspiritus hat wahrscheinlich irgend einen Stimulator der Peroxydase extrahiert.

Die zweite Portion, nachdem sie durch Citronensäure angesäuert wurde, 75.

Die zweite und vierte Portion wurden für 2 Tage in den Dialysator gestellt. Folgende Quantitäten von Peroxydase wurden gefunden:

Zweite Portion	46
Vierte Portion	0

Versuch 21.

Zwei Portionen von buchenen Hobelspänen zu 16 g; sechstägige Autolyse:

1. n/10 Lösung	100
2. 0,5proz. Lösung von Citronensäure	50

Versuch 22.

In der Apotheke wurden Holzfasern gekauft: *Lignum Quassiae*, *Lignum Sassafras*, *Lignum Guajaci*.

Nach fünftägiger Autolyse in Chloroformwasser wurde keine Peroxydase gefunden.

Aus den in diesem Teil beschriebenen Versuchen folgt:

1. In Holzfaser ist Peroxydase enthalten.

2. Auf Grund der früheren Untersuchungen von *Palladin* ist für die Arbeit der Peroxydase die Anwesenheit eines besonderen Stimulators oder Koferments unbedingt nötig.

Diese Arbeit sollte vor der Arbeit von *W. Palladin* und *H. Popoff*, die in dem 128. Band dieser Zeitschrift erschien, gedruckt werden (wo ein Hinweis auf diese Arbeit steht); aber das durch die Post an die Redaktion dieser Zeitschrift abgeschickte Manuskript ist damals nicht an seinen Bestimmungsort gelangt.

Stabilitätskoeffizient der Blutstruktur.

Von

Géza v. Gerlóczy und Franz Faludi.

(Aus der II. int. Universitätsklinik Budapest.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1922.)

Wie bekannt, findet man eine gewisse Analogie zwischen dem Verhalten kolloidaler und Blutkörperchen-Suspensionen; beide werden auf Wirkung neutraler Salze, mancher konzentrierten Säure, Schwermetallsalze usw. ausgeflockt. Im allgemeinen kann man sagen, daß die meisten Gesetze, welche die Kolloidstabilität bezeichnen, auch für Blutkörperchensuspensionen gültig sind (*Herzfeld* und *Klinger*).

Die Ausflockung, in welcher sich die Stabilitätsverminderung äußert, wird von Senkung der ausgeflockten Teilchen gefolgt. Sowohl die Kontrolle der *Flockungsintensität* als die Beobachtung der *Senkungsphase* können unter gewissen Umständen als Maß der Stabilität dienen. Der ersteren wird beim Studium der Kolloidstabilität Vorzug gegeben; bei letzterer wird man dagegen die Sedimentierungsphase demonstrativer finden.

Die Beobachtung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit gibt ziemlich ausreichenden Aufschluß über die Stabilität der Plasmablutkörperchenmischung. Es besteht nämlich ein weitgehender Parallelismus zwischen Sedimentierungsgeschwindigkeit und Agglutinationsgrad der roten Blutkörperchen (*Starlinger* u. a.).

Spezifisches Gewicht, Viskosität, Oberflächenspannung, elektrische Ladung usw. — Regulatoren der Kolloidstabilität — bestimmen auch die Stabilität der Blutkörperchensuspensionen. *Von den Einflüssen dieser bald befördernden, bald hemmenden Bedingungen auf die Blutstabilität ist eine gewisse, für gleichen Zustand gültige Gesetzmäßigkeit zu erwarten.*

Um diese Gesetzmäßigkeit zu erforschen, schien es günstig, von jenen Berechnungen *Stokes'* auszugehen, welche sich auf die Senkungsgeschwindigkeit der Regentropfen beziehen.

Laut seinen Berechnungen:

$$v \text{ (sec}^{-1}\text{)} = \frac{2g}{9\eta} r^2.$$

Er hat seine Formel folgendermaßen abgeleitet:

Eine gewisse Kugel vom Radius r leidet während der Senkung in der Luft bei mäßiger Geschwindigkeit einen Widerstand (f), welcher mit der Geschwindigkeit (v) und der Luftviskosität (η) proportional ist.

$$f = 6 \pi r \eta v.$$

Ist die absolute Dichte der Kugel d , so wird ihr spezifisches Gewicht $d g$, und das Gewicht:

$$q = \frac{4 r^3 \pi}{3} d g.$$

Der Widerstand wächst bei einer und derselben Kugel mit der Senkungsgeschwindigkeit und Viskosität, infolgedessen wird sie auch bei beständiger Kraft $\left(\frac{4 r^3 \pi}{3} d g\right)$ keine beschleunigte Senkung erfahren, da der Widerstand stets von der bewegenden Kraft in Abrechnung gezogen werden muß. — Die Form:

$$p = m a$$

wird also

$$p - f = m a.$$

Da der Wert des Widerstandes bei unverändertem r und η nur von der Geschwindigkeit abhängt, wird die Differenz $p - f$ mit steigender Geschwindigkeit ständig abnehmen, bis schließlich $p - f = 0$, d. h. die Bewegung wird gleichmäßig.

Bei einer gleichmäßigen Geschwindigkeit

$$q = f,$$

d. h.

$$\frac{4 r^3 \pi}{3} d g = 6 \pi r v \eta.$$

Daraus folgt, daß

$$r = \sqrt[3]{\frac{9}{2} \frac{v \eta}{d g}}.$$

Diese Berechnungen sind natürlich auch bei in Flüssigkeiten sinkenden Körpern anwendbar mit der Einschränkung, daß bei solchen auch der Gewichtsverlust des in die Flüssigkeit gesunkenen Körpers mit zu berechnen ist. D. h.:

$$\frac{4 r^3 \pi}{3} D g - \frac{4 r^3 \pi}{3} d g = q.$$

wo D die Dichte des sinkenden Körpers und d die der Flüssigkeit bedeutet.

Die *Stokes*schen Berechnungen können auch für kolloidale Lösungen gültig gemacht werden, falls der Radius der Teilchen $100 \mu\mu$ überwiegt. Auf diese Weise kann auch die Teilchengröße bestimmt werden:

$$r = \sqrt[3]{\frac{9}{2} \frac{v \eta}{(D - d) g}}.$$

Mit gewissen Modifikationen wird die Formel auch auf Blutkörperchensuspensionen anwendbar.

Wird an Stelle von $\frac{4r^3\pi}{3}$ das Erythrocytenvolumen genommen¹⁾, so

muß auch der Umstand in Betracht gezogen werden, daß sich die Querschnitte immerfort ändern, je nachdem, ob die roten Blutkörperchen mit der Kante oder der Fläche sinken. Beim Sinken mit der Kante ist der Querschnitt etwa $15\mu^2$, beim Sinken mit der Fläche dagegen etwa $43\mu^2$. Der Wert $6r\pi$ also ändert sich; er hängt von der Form der Oberfläche und dem Querschnitt ab. Wird dieser variable Wert mit c bezeichnet, so wird

$$\frac{4r^3\pi}{3} (D - d) g = c \eta v.$$

c wird aus dem Blute bestimmbar, wenn das dem $\frac{4r^3\pi}{3}$ entsprechende Blutkörperchenvolumen, die Blutkörperchendichte (D), die relative Plasmaviskosität (η), Plasmadichte (d) und Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ($v \text{ sec}^{-1}$) festgestellt sind.

Werden vom Citratblute (8 Tle. Blut + 2 Tle. 5 proz. Natr. citr.) – dessen Dichte, die Dichte und Viskosität des Citratplasmas, das prozentuale Verhältnis der roten Blutkörperchen und die Senkungsgeschwindigkeit derselben bestimmt, so wird.

$$c = \frac{9 \cdot 10^{-8} \cdot 981 (D - d)}{v \eta},$$

wo $9 \cdot 10^{-8}$ das in Kubikzentimetern ausgedrückte Volumen eines Citratblutkörperchens bedeutet.

So ist

$$c = \frac{8829 \cdot 10^{-8} (D - d)}{v \eta}.$$

In den Versuchen wurde die Dichte mit *Sprengel-Ostwaldschem* Pyknometer, das Blutkörperchenvolumen mit *Köppe-Hedinschem* Hämatokrit, die Viskosität mit *Beck-Hirschschem* Viskosimeter bestimmt. Die Ergebnisse gelten für 37° C. Die Blutkörperchendichte wurde entsprechend ihrem Volumen aus der Dichte des Gesamtblutes und Plasmas mittels Berechnung bestimmt.

Da die Formel allein bei gleichmäßiger Senkung anwendbar ist, haben wir die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit als gleichmäßig betrachtet, wenn der während einer halben Stunde in 5'- Intervallen kontrollierte Senkungsweg durch mehrere aufeinander folgende Bestimmungen gleich gefunden wurde. Die derart festgestellte Senkungsgeschwindigkeit wurde auf 1 cm und 1 Sekunde umgerechnet. Behufs der Senkungskontrolle haben wir das Citratblut in dünne Pipetten aufgesogen und durch Verschluß der oberen Öffnung festgehalten.

¹⁾ Von der geringeren Anzahl anderer korpuskulärer Elemente wird man ohne größere Fehler absehen können.

Die Befunde beziehen sich auf 10 volle Blutanalysen. Bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials wurde darauf geachtet, daß die einzelnen Blutproben verschiedene Stabilität haben, worüber die parallel ausgeführte *Darányi*sche Serumkolloidlabilitätsreaktion, die *Gerlóczy*sche Plasmalabilitätsreaktion und der Index der Blutkörperchensenkung ausreichende Auskunft gab.

Tabelle I.

Diagnose	v cm sec ⁻¹	$(D - d)$ g m	η	c
Normal ♀	$10 \cdot 10^{-6}$	0,090	1,65	0,48
Anaemia ♀	$17 \cdot 10^{-6}$	0,068	1,70	0,20
Endometritischron. ♀	$72 \cdot 10^{-6}$	0,060	1,55	0,05
Inf. ap. pulm. ♀	$76 \cdot 10^{-6}$	0,066	1,70	0,05
Inf. ap. pulm. ♀	$16 \cdot 10^{-5}$	0,083	1,70	0,03
Aneurysma a. ♀	$20 \cdot 10^{-5}$	0,101	1,70	0,03
Menstruatio ♀	$23 \cdot 10^{-5}$	0,084	1,75	0,02
Cc. ves. fell. ♀	$23 \cdot 10^{-5}$	0,079	1,60	0,02
Nephroscler P. ♂	$27 \cdot 10^{-5}$	0,040	1,65	0,01
Lymphadenitis thc. ♂	$27 \cdot 10^{-5}$	0,047	1,70	0,01

Aus der Tabelle wird vor allem ersichtlich, daß im c -Wert die *Sedimentierungsgeschwindigkeit* dominiert. Wäre die Kanten- oder Flächensenkung von entscheidendem Einfluß, so könnten die c -Werte höchstens im Verhältnis etwa von $15 \mu^2 : 43 \mu^2$ Verschiebungen erfahren. Die in der Tabelle aufgewiesene Verhältniszahl 1:48 überwiegt vielfach jene Querschnittsdifferenzen, welche durch Kanten- oder Flächensenkung verursacht werden können. Diese bedeutende Differenz kann durch den störenden Faktor der Formänderung auch nicht erklärt werden.

Der Querschnitt verringert sich zweifellos proportional der Senkungsgeschwindigkeit.

Die Erklärung dieses merkwürdigen Umstandes wäre unserer Meinung nach anstatt der minder bedeutenden Kanten- oder Flächensenkungsdifferenzen in dem — auch physiologisch eintretenden — *Zusammenballen* der Erythrocyten zu suchen. Durch Sympexis wird der Körperchenquerschnitt gewiß mehr oder weniger — je nach dem Grade der Geldrollenbildung — verkleinert. Während in normalem Blute erst nach längerer Zeit eine Blutkörperchensympexis wahrgenommen werden kann, wird sie in einem Blute labiler Struktur in wenigen Minuten zustande kommen.

Als Ursache der beschleunigten Erythrocytensenkungsgeschwindigkeit wurde schon von den ersten Erforschern des Phänomens (*Fahraeus*, *Plaut*, *Höber*, *Cinzenmeier* usw.) auch die bei solchen Citratbluten stärker ausgesprochene „*Hämagglutination*“ angenommen; jedoch die wiederholt geäußerte Auffassung, daß das durch die Agglutination vergrößerte Aggregat durch Gewichtsvermehrung die Senkungsbeschleunigung herbeiführe, kann auf Grund der Formel nicht für richtig gehalten

werden. Sollten die schnell sedimentierenden Blutkörperchen durch Kolloidadsorption auch ein gewisses Plus erfahren, so wird es die Senkungsgeschwindigkeit doch nur *in Relation mit der Viskosität und mit dem Querschnitte* beeinflussen können. Dies ist um so wahrscheinlicher, da mit der Adsorption grobdisperser Eiweißkörper auch die Neigung zur Agglutination zunimmt.

Die Berechnungen unterstützen also jene Hypothese der Blutkörperchensenkungsbeschleunigung, welche die Hämagglutination für das auslösende Moment der Beschleunigung hält, und zwar auf Grund der eingetretenen Querschnittsverringerung.

Da die Blutkörperchen bei der labilen Blutstruktur bald verkleben, ist bei einer Beobachtung der Sedimentierung während einer halben Stunde der überwiegende Teil der überhaupt zu erreichenden maximalen Senkung bereits abgelaufen. Die Sympexis der normalen roten Blutkörperchen erfolgt dagegen erst nach längerer Zeit — auch dann nur in geringerem Grade. Dies macht es ohne weiteres verständlich, warum *die Blutkörperchensenkung in normalem Citratblute anfangs langsam ist, später dagegen schneller wird.*

Tabelle II.

Diagnose	Senkung in den				Gesamt- senkung binnen 2 Std.
	ersten 30 Min.	zweiten 30 Min.	dritten 30 Min.	vierten 30 Min.	
	mm	mm	mm	mm	mm
Normal ♂	1	1,5	4	5	11,5
Normal ♀	2	2	5	9	18
Tabes dors. ♂	4	6	11	8	29
Emphysema pulm. ♂	22	14	8	4	48
Polyarthritiserheumat. ♀	60	8	2	1	71

Aus den Berechnungen erfolgen also einfache und annehmbare Aufklärungen einiger sonst kaum leicht verständlicher Prozesse der differenten Blutkörperchensedimentierungsgeschwindigkeiten. Auch die *Stabilisierung* des nach längerem Intervalle wieder aufgeschüttelten und auf die Sedimentierungsprobe wiederholt eingestellten Citratblutes wäre mit Hilfe der Agglutinations- bzw. Querschnitttheorie leichter erklärlich. Es ist nämlich schon aus der Physiologie lange bekannt, daß *die Erythrocytensympexis nach Ablauf längerer Zeit sich wieder auflöst und nicht neuerlich erfolgt.*

Werden die gewaschenen roten Blutkörperchen statt in eigenen Citratplasmen in reinen Salzlösungen suspendiert, so wird eine erhebliche Verlangsamung der Senkungsgeschwindigkeit eintreten (*Oettinger, Starlinger u. a.*). Diese Stabilisierung ist um so interessanter, da die spezifischen Gewichte der isotonischen Salzlösungen hinter den Plasmaspezifischen Gewichten bleiben, und ihre Viskosität ungefähr gleich 1 ist.

Die Wirkung der Salzlösungen ist auch darin zu suchen, daß *durch die gehinderte Blutagglutination* (ausführliche Versuche siehe bei *Runnström*) *der Blutkörperchenquerschnitt größer bleibt*.

Als praktisch nützlich soll erwähnt werden, daß der weitgehende Parallelismus, welcher zwischen den *c*-Werten und Erythrocyten-senkungsgeschwindigkeiten besteht, uns ermöglicht, mit der Senkungs-kontrolle eine *empirische Reihe der c-Werte* zusammenzustellen. Werden die Plasmaviskosität oder Blutkörperchendichte anstatt den lang-wierigen Messungen einfach aus der Formel berechnet, mit auf empiri-schem Wege bestimmtem *c*-Wert, so beträgt der Fehler nicht mehr als ungefähr 6 bis 8%.

Die Berechnung erfolgt folgendermaßen:

$$D = \frac{c v \eta}{8829 \cdot 10^{-8}} + d,$$

$$\eta = \frac{8829 \cdot 10^{-8} (D - d)}{c v}.$$

In der folgenden Tabelle sind manche berechnete bzw. gefundene Werte von η und D vergleichend zusammengestellt.

Tabelle III.

η		D	
berechnet	gefunden	berechnet	gefunden
1,61	1,70	1,124	1,126
1,45	1,55	1,101	1,106
1,70	1,62	1,098	1,100
1,50	1,47	1,086	1,078
1,63	1,57	1,090	1,096

Zwischen den berechneten und gefundenen Werten zeigt sich eine über-raschend geringe Abweichung.

Wenn die Formel aus dem Sichtpunkte der klinischen Anwendbar-keit geprüft wird, wird vor allem offenkundig, daß die Messungen, welche sich auf Plasma- oder Blutviskosität, „Globulinvermehrung“, Blutagglutination, Plasma-spezifisches-Gewicht, Blutkörperchen-spezi-fisches-Gewicht, Senkungsgeschwindigkeit beziehen, erst dann als *genauer Ausdruck der Blutstabilität* verwertet werden können, wenn ihre einzelnen Komponenten nicht gesondert, sondern die zwischen ihnen bestehende Relation geforscht wird. Das Studium der Blutstabilität, bzw. das Streben, die Blutstabilität genau ausdrücken zu können, hat seine klinische Bedeutung analog mit den verschiedenen Kolloid-labilitätsproben, Oberflächenspannungsbestimmungen, Erythrocyten-senkungsproben usw. Der Labilitätsgrad wird noch am annäherndsten mit der Senkungsprobe bestimmt.

Das verschiedene Senkungsvermögen der roten Blutkörperchen war auch im Mittelalter schon bekannt, wurde aber erst seit den Untersuchungen von *Fahraeus* wieder in den Mittelpunkt des Interesses gestellt und mit Anwendung moderner kolloidchemischer Gesetze in vielen Beziehungen auch erklärt. Der Parallelismus der Senkungsgeschwindigkeit mit der Plasmakolloidstabilität wurde von einem von uns und von *Oettingen* gefunden.

Wie sich der Mechanismus des komplizierten intermediären Stoffwechsels vollzieht, ist kaum nachzufolgen, und so ist man über die Ursache der Blutstrukturänderungen noch absolut nicht im klaren. Entzündliche und degenerative Krankheiten verschiedenster Natur, sowie selbst der physiologische Prozeß der Gravidität gehen ebenfalls mit Blutlabilität einher. So muß der diagnostische Wert gering geschätzt werden. *Westergren* hat als erster die Erfahrung gemacht, daß bei Lungentuberkulose Progredienz der Krankheit die Senkungsgeschwindigkeit beschleunigt, Besserung hingegen dieselbe verlangsamt. Auf Grund seiner Untersuchungen wird die Probe bei *Frisch* und *Starlinger*, *Dreyfuß* und *Hecht* als Index auf den benignen oder malignen Charakter, d. h. auf die *Aktivität* der Krankheit benutzt. — Auf diesem Gebiete, d. h. in der *Kontrolle des Krankheitsverlaufs* kann uns die systematische Bestimmung der Blutstabilität wertvolle Dienste leisten. Um diese zu erforschen, wird unter gewissen Umständen die Berechnung des Blutstabilitätskoeffizienten — *als eine genaue Definition des Stabilitätsgrades* — erforderlich.

Als kurze Zusammenfassung können wir sagen, daß:

1. Aus der Dichtedifferenz des Plasmas und der Blutkörperchen, aus der Plasmaviskosität und aus dem Mittelwert der Blutkörperchen-senkungsgeschwindigkeit durch Berechnung eine Zahl erhältlich ist, die als Stabilitätskoeffizient (*c*) der physikochemischen Blutstruktur ein mit der Blutkörperchensympexis paralleles System bildet.

2. Die Bestimmung dieses Koeffizienten eignet sich zur genauen Definition der Blutkörperchenstabilität und wird praktisch bei der Kontrolle des Krankheitsverlaufs anwendbar.

Literatur.

Darányi, Deutsch. med. Wochenschr. 17, 1922. — *Dreyfuß* und *Hecht*, Münch. med. Wochenschr. 21, 1922. — *Fahraeus*, Hygieia 1918; diese Zeitschr. 89, 1918; Votr. Tagung d. Deutsch. Physiol. Ges. 1920. — *Gerlóczy*, Klin. Wochenschr. 48, 1922. — *Herzfeld* und *Klinger*, diese Zeitschr. 87, 1918. — *Linzenmeier*, Pflügers Arch. 118, 1920. — *Plaut*, Münch. med. Wochenschr. 67, 1920. — *Runnström*, diese Zeitschr. 123, 1921. — *Starlinger*, ebendasselbst 114, 1921. — *Stokes*, zitiert *H. Hardovsky*, Handb. d. biol. Arbeitsmeth. 2, Abt. III; zitiert *Rohrer*, Physica, Budapest 1914. — *Westergren*, Brit. Journ. of tbc. 2, 1921.

Über ein Phänomen bei der Agglutination von Typhusbazillen in salzarmem Medium.

Von

H. Nishiguchi aus Osaka.

(Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern.)

(Eingegangen am 28. Oktober 1922.)

Seit den Untersuchungen von *Bordet* (1899), die seitdem durch zahlreiche Autoren bestätigt und weiter ausgebaut worden sind, wissen wir, daß zur sinnfälligen Agglutination von Bakterien durch das zugehörige Agglutinin die Anwesenheit von Kochsalz oder eines anderen Elektrolyten notwendig ist. Die Bindung des Agglutinins an die Bakterien findet zwar auch in destilliertem Wasser statt, die Ausflockung aber erfolgt nur bei Gegenwart des Elektrolyten.

Bei Untersuchungen an gereinigten Immunsera, über die noch besonders berichtet werden soll, begegnete ich nun einem auffälligen Verhalten in der Agglutination von Typhusbazillen, das ich bisher nicht beschrieben gefunden habe und das mir daher mitteilenswert erscheint. Es handelt sich dabei um das Auftreten einer *Hemmungszone*, wenn als Verdünnungsflüssigkeit nicht NaCl-Lösung, sondern destilliertes Wasser benutzt wird. An sich sind Hemmungszonen bei Agglutinationsversuchen eine alltägliche und bekannte Erscheinung; diese bekannten Hemmungen treten aber am Beginn der Reihe, bei den stärksten Serumkonzentrationen auf, während die hier zu beschreibende innerhalb der Reihe eine Lücke, gleichsam eine Zäsur bildet.

Ich benutzte bei meinen Versuchen ein Typhusimmunserum vom Pferd, das, bei Ansetzung des Agglutinationsversuchs in der üblichen Weise, also mit 0,85 proz. NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel, den von mir verwendeten Typhusbazillenstamm bis zur Verdünnung 1:20000 bis 50000 agglutinierte; die Agglutination zeigte keinerlei Abweichung vom normalen Typus, sie nahm regelmäßig mit der Serumkonzentration ab, und nur ausnahmsweise war sie in der Verdünnung 1:10 etwas schwächer als bei 1:20. Ganz anders ist das Bild, wenn NaCl-Lösung vermieden und zur Herstellung der Serumverdünnungen Aqua destillata benutzt wird. Aus Tabelle I ist der Agglutinationsverlauf in NaCl-Lösung und in Aqua destillata ersichtlich. Es zeigt sich dabei, daß die Ausflockung der Bakterien in Aqua destillata

keineswegs völlig ausbleibt. Sie ist in dem angeführten Beispiel sogar nach 24stündiger Einwirkungsdauer fast ebenso kräftig wie die Agglutination in NaCl-Lösung und findet wie die letztere erst bei der Serumverdünnung 1:50000 ihre Grenze. Das, was sie aber auf den ersten Blick von einer normalen Agglutination unterscheidet, ist die Tatsache, daß sich die *Agglutinationsreihe aus zwei vollständig getrennten Abschnitten* zusammensetzt. Die Agglutination verläuft von der Serumverdünnung 1:10 bis 1:100 in regelmäßigem Abfall, um bei 1:200 und 1:500 völlig zu verschwinden. Bei der Verdünnung 1:1000 setzt dann erneut eine kräftige Agglutination ein, die wiederum allmählich in ihrer Stärke, entsprechend der fortschreitenden Serumverdünnung, abnimmt, aber bis zur Verdünnung 1:50000 noch nachweisbar ist.

Tabelle I.

Typhusserum (Pferd), Agglutination von Typhusbazillen.

Verdünnungs- flüssigkeit	Nach 2 Stunden		Nach 24 Stunden	
	Aqua dest.	0,85proz. NaCl	Aqua dest.	0,85proz. NaCl
1: 10	+++	+++	+++ ¹⁾	+++ ²⁾
1: 20	++	+++	+++	+++
1: 50	+	+++	++	+++
1: 100	+	+++	+	+++
1: 200	—	+++	—	+++
1: 500	—	+++	—	+++
1: 1000	+	+++	+++	+++
1: 2000	+	+++	+++	+++
1: 5000	+	++	++	+++
1: 10000	+	+	+	++
1: 20000	—	+	+	+
1: 50000	—	—	+	+
Kontrolle	—	—	—	—

Der Agglutinationstypus in Aqua destillata ist weiterhin dadurch ausgezeichnet, daß die Agglutination stets *feinflockig* verläuft. Auch die stärkeren Konzentrationen unterscheiden sich in dieser Hinsicht deutlich von den entsprechenden Kontrollröhrchen in NaCl-Lösung.

Das eben geschilderte Phänomen hat sich bei zahlreichen Wiederholungen durchweg in gleicher Weise reproduzieren lassen. Freilich war die Agglutination in Aqua destillata nur in einigen Fällen so kräftig wie bei dem in Tabelle I wiedergegebenen Versuch. In der Regel blieb die Agglutination gegenüber der Reaktion in Kochsalzlösung nach Stärke der Wirkung erheblich zurück. Aber auch da, wo die Agglutination nur schwach war, wurde der charakteristische Verlauf der Reihe beobachtet. Ein Beispiel dieser Art sei ebenfalls wiedergegeben (Tabelle II).

¹⁾ Feinflockig.²⁾ Grobflockig.

Tabelle II.
Typhusserum (Pferd).

Verdünnungs- flüssigkeit	Nach 2 Stunden		Nach 24 Stunden	
	Aqua dest.	0,85proz. NaCl	Aqua dest.	0,85proz. NaCl
1: 10	+	++	+	+++
1: 20	+	+++	+	+++
1: 50	—	+++	+	+++
1: 100	—	+++	+	+++
1: 200	—	+++	—	+++
1: 500	—	++	—	+++
1: 1000	+	+	+	++
1: 2000	—	+	+	+
1: 5000	—	+	+	+
1: 10000	+	+	+	+
1: 20000	—	+	+	+
1: 50000	—	—	—	+
Kontrolle	—	—	—	—

Bemerkenswerterweise kommt es mitunter vor, daß auch die *zweite* Phase der Agglutination zu Beginn die gleiche Hemmung zeigt, wie man sie unter gewöhnlichen Verhältnissen bei Verwendung starker Serumkonzentrationen zu erhalten pflegt und wie sie z. B. in Tabelle II bei der Serumverdünnung 1:10 in NaCl-Lösung zutage tritt. In einigen späteren Versuchen läßt sich diese Erscheinung ohne weiteres beobachten, indem die nach der Lücke neu einsetzende Agglutination in der ersten Verdünnung (1:500 bzw. 1:1000) noch nicht so stark ist wie in der folgenden (vgl. Tabelle III und IV).

Um die Erscheinung genauer zu analysieren, habe ich weiterhin Parallelversuche angestellt in der Weise, daß zur Aufschwemmung der Typhusbazillen und zur Verdünnung des Serums NaCl-Lösungen von *verschiedenem Kochsalzgehalt* verwendet wurden. Zu diesem Zwecke habe ich nebeneinander zwölf Agglutinationsreihen angesetzt. In der ersten wurde als Verdünnungs- bzw. Aufschwemmungsfüssigkeit physiologische Kochsalzlösung (0,85 %) verwendet, in der letzten Reihe Aqua destillata, dazwischen Lösungen mit einem Kochsalzgehalt fallend von 0,5 bis 0,0005 %.

Ich verzichte auf eine Wiedergabe der Protokolle. Das Ergebnis war bei Wiederholung des Versuchs das gleiche. Es zeigte sich, daß schon bei einer Verminderung des NaCl-Gehalts auf 0,05 und 0,025 % die Agglutinationskurve in der kritischen Zone (1:100 und 1:200) eine *Einsenkung* aufweist, und von 0,01 % an trat immer die charakteristische *Lücke* auf, wie in Aqua destillata, und zwar an der gleichen Stelle.

Auch die Wahl eines anderen *Elektrolyten* ließ prinzipiell das gleiche Verhalten erkennen. Ich habe in der eben beschriebenen Versuchsanordnung in einzelnen Fällen die Kochsalzlösungen durch Lösungen von Natriumhyposulfit in verschiedener Konzentration ersetzt und

ebenfalls das Phänomen der zweiteiligen Kurven erhalten. Die Lücke trat in diesem Falle ungefähr an der gleichen Stelle auf, wie in der Kochsalzreihe (0,01 %).

Die bisherigen Versuche zeigen also, daß bei der Herabsetzung des Elektrolytgehalts der Suspensionsflüssigkeit von einer gewissen Grenze ab die Agglutinationskurve eine Unterbrechung erfährt, und daß dieses Phänomen selbst dann auftritt, wenn als Verdünnungsflüssigkeit Aqua destillata dient. Völlig ausgeschaltet sind ja auch in dem letzteren Falle die Salze nicht, da sowohl das Serum als auch die Bakterien Salze enthalten.

Ich benutzte deshalb für die folgenden Versuche Bakterien und Sera, die durch *Dialyse* von NaCl befreit und noch auf andere Weise gereinigt waren. In der ersten Versuchsreihe wurden folgende Proben geprüft:

a) Eine Portion des bisher angewendeten agglutinierenden Typhuserums wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis mit Hilfe von Silbernitrat keine Spur von Chlor mehr im Dialysat nachweisbar war („*dialysiertes Serum*“).

b) Im Anschluß an die Methode von *Gibson* werden 50 ccm des Immunsersums mit 50 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt, der Niederschlag nach 2 Stunden abfiltriert und in steriler Aqua destillata aufgenommen, dann dialysiert („*dialysiertes Präzipitat*“).

c) Zur Kontrolle diente das unbehandelte Immuns Serum („*Originalserum*“).

Alle Verdünnungen wurden mit Aqua destillata angesetzt, außerdem noch eine weitere Kontrollreihe mit dem Originalserum und 0,85proz. NaCl-Lösung.

Die Bakterienaufschwemmung wurde teils in gewöhnlicher Weise hergestellt, indem der Rasen einer 24stündigen Agarkultur in Aqua destillata aufgeschwemmt (je 2 ccm auf eine Agarkultur) und eine halbe Stunde bei 60° erhitzt wurde, teils erfolgte die Aufschwemmung erst nach Beseitigung der Salze. Zu diesem letzteren Zweck wurde eine Aufschwemmung von abgetöteten Typhusbakterien in steriler Aqua destillata der Dialyse unterworfen, genau wie das oben unter a) angeführte Serum („*dialysierte Bakterien*“). In der Kontrollreihe mit dem Originalserum und NaCl-Lösung wurde auch für die Abschwemmung des Bakterienrasens NaCl-Lösung benutzt.

Das Ergebnis ist aus Tabelle III ersichtlich. Bei völliger Abwesenheit von Elektrolyten war die Ausflockung fast ganz aufgehoben, das *dialysierte Serum* agglutinierte *dialysierte* Bakterien selbst nach 24 Stunden in den Verdünnungen 1:10 und 1:20 nur schwach, und in der Verdünnung 1:50 trat lediglich noch eine unvollständige Agglutination ein. Ebenso schwach wirksam erwies sich das *dialysierte Präzipitat*, und zwar in

Tabelle III.
Agglutination.

Nach 24 Stunden						
Bakterien- auf- schwemmungen	Dialysiertes Serum	Dialysiertes Präzipitat		Nicht dialysiertes Originalserum		Nicht dialysiertes Originalserum
	Dialysierte Bakterien	Dialysierte Bakterien	Nicht dialysierte Bakterien	Dialysierte Bakterien	Nicht dialysierte Bakterien	Nicht dialysierte Bakterien
Verdünnungs- flüssigkeit	Aqua dest.	Aqua dest.	Aqua dest.	Aqua dest.	Aqua dest.	0,85proz. NaCl
1: 10	+	+	+	+	+	+++
1: 20	+	+	+	+	+	+++
1: 50	±	±	+	+	+	+++
1: 100	—	—	—	+	—	+++
1: 200	—	—	—	—	—	+++
1: 500	—	—	—	—	+	+++
1: 1000	—	—	—	—	+	++
1: 2000	—	—	—	—	+	+
1: 5000	—	—	—	—	+	+
1: 10000	—	—	—	—	+	+
1: 20000	—	—	—	—	+	+
1: 50000	—	—	—	—	+	+
Kontrolle	—	—	—	—	—	—

gleicher Weise mit dialysierten und nicht dialysierten Bakterien. Nicht wesentlich stärker war die Ausflockung dialysierter Bakterien durch das nicht dialysierte Originalserum (1:100). In den höheren Verdünnungen tritt in keiner der Reihen von neuem Agglutination auf. Einzig und allein bei Verwendung von unbehandeltem Originalserum und *nicht* dialysierten Bakterien in destilliertem Wasser ist wieder das in Rede stehende Phänomen, nämlich die Lücke in der Agglutinationskurve zu beobachten. Die Ausflockung hört auch in diesem Falle an derselben Stelle auf, wie in den übrigen Reihen, setzt aber nach zwei Verdünnungsstufen wieder ein, um weiterhin allmählich abnehmend schließlich dieselbe Grenze zu erreichen wie in der Kontrollreihe mit NaCl-Lösung. Die Agglutination ist dabei zwar schwach, der charakteristische Verlauf aber deutlich.

Das gleiche Bild zeigt eine weitere Versuchsreihe, in der neben dem Originalserum ein nach der Methode von *Banzhaf* gereinigtes und konzentriertes Serum zur Verwendung gelangte, wobei durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat die Pseudoglobuline isoliert wurden; das Ammoniumsulfat wurde dann durch Dialyse entfernt. Mit jedem der beiden Sera wurde eine Agglutinationsreihe mit 0,85proz. NaCl-Lösung als Verdünnungsflüssigkeit angesetzt, ferner eine Reihe mit destilliertem Wasser und eine letzte mit destilliertem Wasser und durch Dialyse von Elektrolyten befreiten Bakterien. Das Ergebnis war wieder prinzipiell dasselbe (Tabelle IV). Das gereinigte Serum, das

noch in der Verdünnung 1:1000000 Typhusbazillen ausflockt, agglutiniert dialysierte Bakterien in Aqua destillata unvollkommen bis 1:20, und auch nicht dialysierte Bakterien werden kaum besser beeinflusst. *Die Lücke in der Agglutination tritt nur bei der Verwendung nicht dialysierten Serums und nicht dialysierter Bakterien in destilliertem Wasser als Verdünnungsflüssigkeit auf.*

Tabelle IV.

Agglutination in salzarmem und salzfreiem Medium (Typhusbazillen).

Serumverdünnung		Originalserum			Gereinigtes und dialysiertes Serum (Banshofs Methode)		
		Bakterien			Bakterien		
		Nicht dialysiert	Nicht dialysiert	Dialysiert	Nicht dialysiert	Nicht dialysiert	Dialysiert
		0,85proz. Na Cl	Aqua dest.	Aqua dest.	0,85proz. Na Cl	Aqua dest.	Aqua dest.
1:	10	++	++	+	+++	(+)	+
1:	20	++	++	+	++	+	+
1:	50	+++	+(+)	—	++	—	—
1:	100	+++	—	—	+++	+	—
1:	200	+++	—	—	+++	—	—
1:	500	+++	—	—	+++	—	—
1:	1000	+++	—	—	+++	—	—
1:	2000	+++	+	—	+++	—	—
1:	5000	+++	—	—	+++	—	—
1:	10000	+++	—	—	+++	—	—
1:	20000	++(+)	—	—	+++	—	—
1:	50000	+	—	—	+++	—	—
1:	100000	+	+	—	+++	—	—
1:	200000	—	+	—	++	—	—
1:	500000	—	—	—	+(+)	—	—
1:	1000000	—	—	—	+	—	—
Kontrolle		—	—	—	—	—	—

Schließlich habe ich in einer Reihe weiterer Versuche mit Originalserum und gereinigtem Serum, mit lebenden und abgetöteten Typhusbazillen die *Bindungsverhältnisse* des Agglutinins untersucht. Es genügt, einen der Versuche zu besprechen, da das Ergebnis in allen grundsätzlich das gleiche war (vgl. Tabelle V).

Es wurden von dem Originalserum mit lebenden Typhusbazillen zwei Agglutinationsreihen angesetzt, die eine mit destilliertem Wasser, die andere — lediglich zur Kontrolle — mit 0,85proz. NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel. Es trat nun das bekannte Bild auf, nämlich starke und regelmäßige Agglutination in der NaCl-Reihe, schwächere und bei den Serumverdünnungen 1:100 und 200 unterbrochene in der Reihe mit destilliertem Wasser. Nach 24 Stunden wurden aus sämtlichen Röhren der Wasserreihe die Bakterien scharf auszentrifugiert, der

Tabelle V.

Typhusserum (Originalserum) und Typhusbakterien (lebend, unbehandelt).

Verdünnungs- flüssigkeit oder Bakterien	A Vorversuch	B Kontrollversuch	Bakteriensediment v. A, zentrifugiert und gewaschen	Abguß von A
	Aqua dest.	0,85proz. NaCl	0,85proz. NaCl	Bakterien in NaCl
1: 10	+	++++	++++	+
1: 20	+	++++	++++	+
1: 50	+	++++	++++	+
1: 100	—	++++	++++	—
1: 200	—	++++	++++	—
1: 500	+	++++	++	—
1: 1000	+	++	++	—
1: 2000	+	+	+	—
1: 5000	+	+	+	—
1: 10000	—	+	+	—
1: 20000	—	+	—	—
1: 50000	—	—	—	—
Kontrolle	—	—	—	—

Abguß für weitere Prüfung verwendet und von dem Sediment der Rest der Flüssigkeit zunächst vorsichtig mit Fließpapier abgesaugt, dann das Sediment mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden einerseits die abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien in 0,85proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt, andererseits zum Abguß neuerdings Typhusbazillen in NaCl-Lösung hinzugefügt.

Es zeigte sich, daß in bekannter Weise, obwohl die Ausflockung unterblieben war, eine *Bindung des Agglutinins an die Bakterien* erfolgt war. Nach Aufschwemmung der Bakterien in NaCl-Lösung trat die Ausflockung ein, genau in der gleichen Art und Stärke, wie in der von vornherein mit NaCl angesetzten Reihe, die beiden Reihen stimmen fast völlig miteinander überein. Demgemäß enthielt die von den Bakterien abgegossene Flüssigkeit keine Agglutinine mehr. Neu eingebrachte Typhusbazillen (in NaCl-Lösung aufgeschwemmt) wurden in den ersten drei Verdünnungsstufen noch schwach agglutiniert, in den weiteren Verdünnungen blieb jede Agglutination aus. Das Agglutinin war also ganz an die Bakterien gebunden worden und nur in den stärksten Serumkonzentrationen (1:10 bis 1:50) hatten die Bakterien nicht die ganze zur Verfügung stehende Agglutininmenge erschöpft.

Die *Erklärung* dieses Phänomens der unterbrochenen Agglutinationsreihe stößt auf Schwierigkeiten. Daß der Gehalt an NaCl oder anderen Elektrolyten für das Zustandekommen dieser Erscheinung von Bedeutung ist, kann nicht bezweifelt werden. Aus den Versuchen mit allmählich abnehmender Konzentration des Elektrolyten geht das ohne weiteres hervor. Damit ist jedoch noch nicht viel erklärt. Denn innerhalb der einzelnen Versuchsreihe ist ja die Menge des Elektrolyten bis auf

die geringen, aus dem Serum stammenden Mengen, die wohl in den späteren Verdünnungen vernachlässigt werden können, in allen Röhrchen die gleiche. Das gilt auch für den extremen Fall, daß zur Herstellung der Serumverdünnungen und zur Aufschwemmung der Bakterien ausschließlich Aqua destillata verwendet worden ist; die Elektrolytmenge besteht hier in den Spuren, die in den Bakterien enthalten sind, und in den etwa von dem Nährboden mit übertragenen Salzmengen (Soda). Daß diese für die Ausflockung nicht belanglos sind, ist klar und seit langem bekannt [vgl. Joos¹⁾, Lange²⁾ u. a.]. Warum reicht aber die vorhandene Menge des Elektrolyten in der ganzen Reihe aus, um die Ausflockung herbeizuführen, und läßt nur bei gewissen Serumverdünnungen, fast stets bei den Verdünnungen 1:200 und 1:500, im Stich? Man könnte daran denken, daß in den stärkeren Serumkonzentrationen der Gehalt des Serums an Elektrolyten noch zur Ausflockung der mit Agglutinin beladenen Bakterien genügt, weiterhin aber nicht mehr; daß dann aber in den schwächeren Serumkonzentrationen mit ihrem minimalen Serumgehalt eine Auslaugung der Bakterien stattfindet, ähnlich wie in destilliertem Wasser allein, und daß so die für die Ausflockung nötigen Elektrolytmengen in die Flüssigkeit gelangen; dazwischen würde eine Gleichgewichtszone liegen, in der die Ausflockung unterbleibt. Die Tatsache, daß bei Verwendung *dialysierter* Bakterien die Agglutination in den höheren Serumverdünnungen nicht wieder auftritt, wäre im Sinne dieser Erklärungsmöglichkeit zu verwerten. Andererseits müßte man bei dieser Deutung erwarten, daß durch die Verwendung gereinigten, dialysierten Serums und nicht dialysierter Bakterien in erhöhtem Maße die für eine stärkere Ausflockung ausreichende Elektrolytmenge aus den Bakterien ausgelaugt würde. Das ist aber nicht der Fall. Denn, wie bereits früher erwähnt, läßt sich das Phänomen immer nur hervorrufen, wenn die Agglutination mit dem unveränderten Originalserum und mit unbehandelten Bakterien in destilliertem Wasser angestellt wird. Man könnte also höchstens noch vermuten, daß mit der Reinigung des Serums und nachfolgender Dialyse vielleicht noch andere, für das Zustandekommen der unterbrochenen Agglutinationsreihe erforderliche Substanzen beseitigt werden (Euglobulin, Albumin?). Wenn freilich die minimalen Elektrolytmengen, die den Bakterien anhaften und aus den Bakterien ausgelaugt werden, eine ausschlaggebende Rolle spielten, dann müßte, bei Verwendung sehr schwacher NaCl-Lösungen als Verdünnungsflüssigkeit, mit steigendem NaCl-Gehalt die Hemmungszone nach der Richtung der höheren Serumverdünnungen verschoben werden, und auch das ist nicht der Fall.

¹⁾ Zeitschr. f. Hyg. 36, 1901.

²⁾ Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 24, 1916.

Soweit eine Unterbrechung auftritt, stellt sie sich in solchen Parallelreihen, wie erwähnt, überall bei derselben Serumverdünnung ein.

Es sind also offenbar noch andere Faktoren beteiligt. Für die Hemmungszone am Beginn der Agglutinationsreihe liegen auch schon Beobachtungen vor, aus denen das hervorgeht. So hat z. B. *Loewenthal*¹⁾ gezeigt, daß in menschlichen Ruhrsera die in den stärkeren Serumkonzentrationen gehemmte Agglutination voll zur Wirkung gelangen kann, wenn das Serum inaktiviert wird, und *Heuer*²⁾ hat mitgeteilt, daß die Hemmung wegfällt, wenn als Verdünnungsmittel nicht NaCl-Lösung sondern normales Serum benutzt wird. Bei der Wirkung der Inaktivierung könnte man vielleicht an Agglutinoide denken. Daß meine Beobachtung nicht auf Störung durch Agglutinoide beruhen kann, geht zweifelsfrei aus der Tatsache hervor, daß bei Übertragung der nicht agglutinierten Bakterien in NaCl-Lösung die Ausflockung in normaler Weise erfolgt.

Der ganze Vorgang stellt, wenn ich den Ausdruck gebrauchen darf, das Negativ eines Versuchs zur Feststellung des isoelektrischen Punktes oder einer Säureagglutination dar. Hier tritt nur in einer bestimmten Zone Ausflockung auf, in meinen Versuchen bleibt sie in einer bestimmten Zone aus.

Es mag auffallend sein, daß die Erscheinung der Lücke innerhalb der Agglutinationsreihe unter den von mir studierten Verhältnissen bisher nicht beschrieben worden ist. Vielleicht liegt dies daran, daß bei Verwendung so hochwertiger Sera, namentlich für diagnostische Zwecke wohl in der Regel nur mit stärkeren Verdünnungen gearbeitet wird und man die Reihen nicht schon mit der Serumkonzentration von 1:10 zu beginnen pflegt. Hätte ich mit der Verdünnung 1:100 oder 1:200 begonnen, so hätte ich von einer Lücke nichts wahrgenommen, und die Erscheinung hätte einfach als Hemmungszone am Beginn der Reihe imponiert und nichts Auffälliges geboten. Es wäre durch erneute Untersuchungen unter Benutzung stärkster Serumkonzentrationen festzustellen, ob nicht vielleicht überhaupt die bekannte Hemmungszone am Beginn der Reihe in Wirklichkeit eine Lücke innerhalb der Reihe ist.

¹⁾ Zeitschr. f. Hyg. 72, 1912.

²⁾ Ebendasselbst 95, 1922.

Über Nitroreduktionen durch lebende Gewebe.

Von

N. Waterman und J. Kalff.

(*Antoni v. Leeuwenhoekhuis*' und organisch-chemisches Laboratorium der Universität Amsterdam.)

(Eingegangen am 1. November 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

1. Diese Studien nahmen ihren Ausgangspunkt von der Frage, wie sich die Atmung von Tumorzellen in Vergleich mit jener von normalen Zellen verhält. Dieser Gegenstand hat erhebliche Bedeutung, einmal wegen des Zusammenhanges zwischen Zellteilung und O_2 -Verbrauch, andererseits auch wegen der Auffassung, die in unseren vorigen Studien entwickelt wurde, wonach das Tumorproblem auch von physikalisch-chemischer Seite zu betrachten ist, und wobei deshalb auch (in Anlehnung an die Versuche *Warburgs* (1), die Relation von Oberfläche und O_2 -Verbrauch betreffend) besondere Verhältnisse der Atmung zu erwarten sein dürften.

Diesbezügliche Untersuchungen wurden schon mehrfach in Angriff genommen, merkwürdigerweise mit gänzlich verschiedenem Ergebnis, je nach der benutzten Methode. Während *Drew* (2) mit der klassischen *Ehrlichschen* Methylenblaumethode, die auch wieder von *Thunberg* in ausgiebigster Weise für seine Atmungsstudien benutzt wurde, fand, daß Tumorgewebe bedeutend *weniger* O_2 -Zehrung hat wie normales Kontrollgewebe, führte die Benutzung der einwandfreien *Barcroftschen* (3) manometrischen Methode zu ganz anderen Ergebnissen. Zu gleicher Zeit zeigten *Russel* und *Gye* (4) sowie *Dirken* und *Waterman* (5), daß Tumorgewebe nicht nur *reichlich Sauerstoff* verbraucht, sondern daß gerade in vielen Fällen die Zehrung noch bedeutender ist als bei bestimmten normalen Organen und im allgemeinen auch länger nach der Herausnahme aus dem Körper fort dauert. *Russel* und *Gye* benutzten die *Barcroftsche* Methode auch weiter zur Prüfung mehrerer Fragen, z. B. zur Berechnung des *respiratorischen Quotienten von Tumorgewebe*.

Wir werden das *Barcroft-Haldanesche* Prinzip als bekannt voraussetzen und nur anführen, daß die Methode einen derartigen Grad von Genauigkeit besitzt, daß ihre Resultate als einwandfrei betrachtet werden müssen.

Die Kontroverse muß denn auch sicher ihren Ausgangspunkt in der Verwendung der Methylenblaumethode finden. Es hat sich herausgestellt, daß diese Methode aus mehreren Gründen unzureichend ist¹⁾ und daß die Entfärbung des Methylenblaus ein überaus komplizierter Prozeß ist, der jedenfalls als Indikator für Reduktionen im Tierkörper nicht zu verwenden ist. Es berührt eigentümlich, wenn man erwägt, daß die grundlegende *Ehrlichsche* Monographie eben auf diesem Fundamente geruht hat.

Nun erfordert die *Barcroft'sche* Methode immer doch eine besondere Apparatur, strenge Imhaltung einer konstanten Temperatur und mehrfache Schüttelungsbestimmungen. Es ist daher selbstverständlich, daß noch leichter auszuführende Methoden mit Freude angenommen würden. Als solche wurde von *Lipschitz* (6) die *Nitroreduktion* angegeben, die in gewissen Kreisen Anklang fand und benutzt wurde, ohne daß, wie es notwendig gewesen wäre, eine eingehende *Nachprüfung* stattgefunden hat. *Lipschitz* hat sein Vorgehen nicht nur zum qualitativen Nachweis, sondern auch zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung empfohlen, auch für wichtige Fragestellungen, so daß hier sicherlich erst einmal nach der Richtigkeit der eigentlicher Grundlage gefragt werden muß.

Lipschitz fügt zu fein geschnittenen Gewebestückchen in Wasser oder Ringerlösung ein wenig reines kristallisiertes farbloses m-Dinitrobenzol, stellt das Ganze in den Brutofen und beobachtet jetzt, wie die vorher klare farblose Flüssigkeit sich innerhalb weniger Stunden orangegelb verfärbt. Die Gelbfärbung gehe der Sauerstoffzehrung parallel. Als färbenden Körper betrachtet *Lipschitz* das aus dem m-Dinitrobenzol durch Reduktion entstandene *m-Nitrophenylhydroxylamin* und wohl auf Grund vornehmlich der *Reaktion mit Soda* (a) und der *Methämoglobinbildung* (b) aus Blutfarbstoff. Er gibt in einer vergleichenden Tabelle (S. 223, l. c.), noch mehrere andere Reaktionen an, die aber in späteren Publikationen nicht mehr erscheinen.

Es muß nach *Neuberg's* älteren Befunden (7) wohl die Möglichkeit oder Wahrscheinlichkeit einer derartigen Reduktion anerkannt werden, und es läßt sich auch die beschriebene Gelbfärbung leicht beobachten, ebenso die Fähigkeit zur Methämoglobinbildung durch das neuerstandene Produkt und eine — bei *unserem* ersten Präparat (von der Technischen Hochschule Delft) wenigstens — schwache Rotfärbung auf Zusatz von Alkali.

Es reagieren in dieser Weise sämtliche normalen Gewebe (Muskel, Niere, Leber), nur *das eigentümliche Verhalten des Tumorgewebes machte uns alsbald stutzig*. Denn sehr frisch dem Körper entnommene Tumor-

¹⁾ Das gilt auch von den ebenfalls versuchten Tellurreduktionen.

gewebe, mit sehr wenigen nekrotischen Teilen, zeigen die Reaktion fast gar nicht, wenigstens wird die obenauf stehende Flüssigkeit kaum gelb gefärbt. *Ebenso war die Rotfärbung mit Soda selbst bei einer kräftigen Gelbfärbung von Tumorstückchen höchstens spurenhaf zu beobachten.*

Die obenauf stehende Flüssigkeit ist opalweißlich, die Stückchen aber sind stellenweise mehr oder weniger gelb gefärbt. Offenbar haftet der entstandene gelbe Körper fester den Stückchen an als das mit dem normalen Gewebe der Fall ist. *Lipschitz* gibt an, daß auch bei normalen Geweben der gelbe Körper den Stückchen zuerst anhafte, später aber sich gänzlich in der Flüssigkeit löse. Dies ist aber nur teilweise der Fall, denn die normalen Organe sind einige Stunden nach der Belassung in der Nitroflüssigkeit ebenfalls schwach gelblich verfärbt und lassen sich auch durch wiederholte Waschungen nicht mehr gänzlich vom Farbstoff befreien.

Wir werden auf dieses verschiedene Verhalten noch zurückkommen müssen; es wurde aber der Anlaß, tiefer kritisch auf die ganze Methode einzugehen.

A priori könnte man nichts anderes als viele Schwierigkeiten erwarten; es ist ein fast aussichtsloses Bemühen in einem derart komplizierten Gemisch die verschiedenen Reduktionsstufen mehr als mit einiger Wahrscheinlichkeit fassen zu können.

2. A. Es wurde, wie es eigentlich selbstverständlich der Fall sein sollte, zuerst versucht das fragliche Reduktionsprodukt, m-Nitrophenylhydroxylamin, auf chemischem Wege wirklich rein darzustellen, die Eigenschaften dieses Körpers zu untersuchen, und zu erforschen, wie es sich in Gegenwart von lebendigem Gewebe verhält. Schon bei der Herstellung nach *Brand* (8) zeigten sich Unstimmigkeiten. *Namentlich wurde die Rotfärbung nach Alkalizusatz vermißt*, so daß angenommen wurde, daß man das reine Produkt noch immer nicht in Händen hätte. Der Schmelzpunkt stimmte aber sehr gut (118 bis 120° korr.); nach mehrfachem Umkristallisieren kam man zum Schluß, daß das reine Produkt *jene Farbenreaktion gar nicht gibt*, und daß die Reaktion wahrscheinlich Verunreinigungen (Thiophenderivaten) zuzuschreiben ist. Inzwischen hat *Brand* (9) diese Tatsache anerkannt. Es ist dies um so mißlicher, weil diese Reaktion von *Lipschitz* nicht nur nebenbei erwähnt, sondern fortwährend herangezogen und sogar quantitativ verwertet wird.

Es führte dieses Ergebnis zu der Vermutung, daß das als Ausgangspunkt benutzte m-Dinitrobenzol nicht ganz rein gewesen ist. Der nächste Schritt hatte also darin zu bestehen, ein völlig reines Ausgangspräparat herzustellen, und erst nach Lösung dieser Aufgabe konnte überhaupt an die Frage getreten werden.

Benzol wurde mittels wiederholter Schwefelsäurebehandlung thiophenfrei gemacht und erst nitriert, nachdem die Isatinreaktion negativ geworden war. Das alsdann bereitete Dinitroprodukt war farblos, mit einem Stich ins Gelbliche. Es wurde ebenfalls von lebendem Gewebe unter Gelbfärbung reduziert, wenn auch anscheinend etwas langsamer. Das entstandene gelbe Produkt gab keine Reaktion mit Alkali, bildete jedoch Methämoglobin.

Es erledigen sich eigentlich damit alle weiteren Untersuchungen, da doch die Unreinheit der Stoffe mit denen *Lipschitz* gearbeitet hat, jetzt feststeht. Es ergeben sich aber noch mehrere interessante Ergebnisse und Unstimmigkeiten.

B. Es bestand nämlich die Absicht, anstatt der aus mehreren Gründen (s. weiter unten) unzureichenden kolorimetrischen Bestimmung, eine exakt-chemische Bestimmungsmethode auszuarbeiten. Als solche wurde als approximativ richtige Methode die Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung gewählt.

Das aus dem m-Dinitrobenzol durch Reduktion nach *Brand* bereitete Hydroxylamin wird abgewogen, in wenig Alkohol gelöst, und zu der vierfachen Menge AgNO_3 [in NH_4OH (0,90), wozu einige Tropfen HCl zugefügt sind und die bis 70° erwärmt ist] gegeben. *Nach der Mischung entsteht ein grobflockiger grauer Niederschlag*, der leicht abfiltrierbar ist und, mit Ammoniak, Wasser, Alkohol ausgewaschen und getrocknet, mit stark rußender Flamme verbrennt. Es entsteht metallisches Silber, das geglüht und gewogen wird. 0,100 g Ausgangsprodukt entsprechen ungefähr 0,074 g Silber. Die Fehlergröße (3 Bestimmungen) beträgt mehr als 5%.

Belege:	I. abgewogene Menge . . .	0,2309 g,	
	gefundenes Silber . . .	0,1773 g,	berechnet. . 0,1708
	II. abgewogene Menge . . .	0,2394 g,	
	gefundenes Silber . . .	0,1795 g,	berechnet. . 0,1771
	III. abgewogene Menge . . .	0,2362 g,	
	gefundenes Silber . . .	0,1715 g,	berechnet. . 0,1747

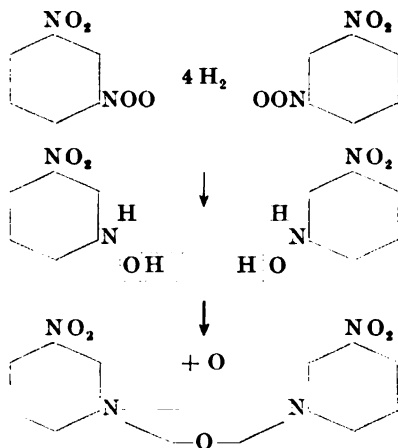
Will man nun das in vitro unter Reduktion von lebenden Geweben entstandene Nitrophenylhydroxylamin in dieser Weise quantitativ bestimmen, so entsteht zu *großer Überraschung kein flockiger Silber-niederschlag*. Man darf nicht annehmen, daß zu geringe Mengen des Stoffes anwesend sind, denn auch sehr verdünnte synthetische Lösungen geben noch diese Reaktion. Das lehrt, daß wenigstens neben dem Hydroxylamin noch andere, nicht mit Silberoxyd reagierende Stoffe anwesend sind. Folgende Versuche weisen denn auch in diese Richtung.

C. Läßt man eine verdünnte alkoholische Lösung des m-Nitrophenylhydroxylamins an der Luft stehen, so opalisiert diese bald, und

es setzt sich ein weißlicher Niederschlag ab. Dieser Prozeß geht unaufhaltsam bei Zimmertemperatur fort, bis die ganze gelbe Lösung umgesetzt und farblos geworden ist. Der entstandene Stoff läßt sich leicht abfiltrieren und analysieren und muß als 3-3'-dinitroazoxybenzol angesehen werden, Schmelzpunkt: 146,5°; Mischprobe: keine Änderung des Schmelzpunktes.

Das Entstehen dieses Stoffes weist auf eine leichte Oxydierbarkeit des Hydroxylamins hin.

Wahrscheinlich wird der Prozeß am besten wie folgt gedeutet:



Noch weitere Umsetzungen sind möglich, sogar bis zu Dinitrohydrazobenzol.

Es ist auch möglich, daß unter anderen Umständen, z. B. bei etwas anderem Alkaligehalt, die Reduktion nicht bis zu der Azoxyverbindung, sondern nur zur Nitrosoverbindung führt und da stehen bleibt. Jedenfalls ist es so weit klar, daß das gebildete Zwischenprodukt ein so unstabiles Produkt ist, daß es nicht angeht, daraus durch Kolorimetrie quantitativ auf eine mehr oder weniger stattgehabte Reduktion zu schließen, zumal, wie das Beispiel des Azoxyprodukts beweist, auch farblose Zwischenprodukte entstehen können. Bildet sich z. B. die Nitrosoverbindung oder die Azoxyverbindung unmittelbar bei einem schnellen Reduktionsvorgang, so bleibt die Reduktion dort stehen, und tritt das gelbe Produkt nicht mehr auf.

Das alles kann außer von stärkerer oder schwächerer Reduktionskraft, von mehreren Umständen abhängen. Änderung im Alkaligehalt wurde schon erwähnt. Es gibt aber noch andere Umstände, vornehmlich Strukturunterschiede, die wichtige Änderungen zeitigen können.

Damit nähern wir uns dem zweiten Teil unserer Ausführungen.

II.

Das ganze *Lipschitzsche* Verfahren spielt sich in einem *inhomogenen* Milieu ab; dazu kommt, daß aus dem praktisch unlöslichen *m*-Dinitrobenzol das lösliche, aber sowohl stark kapillaraktive wie pharmakologisch wirksame Hydroxylaminderivat entsteht oder wenigstens entstehen kann. Hier eröffnen sich zahllose Möglichkeiten zu Komplikationen. Der erzeugte Stoff kann vom Gewebe in mehr oder weniger starkem Umfange adsorbiert werden, er kann sich auch einfach in Zellbestandteile *lösen*, und sowohl in absorbiertem als gelöstem Zustande die weitere vitale Reduktion beeinflussen. Vor allem wird die Adsorption unter der Herrschaft der Struktur stehen. So erklärt sich die von *Lipschitz* angegebene und leicht zu bestätigende Herabsetzung der Gelbfärbung durch kurze Verreibung des Gewebes mit Quarzsand nicht notwendig aus „Ausschwemmung des Atemkörpers“ aus der Zelle, sondern viel besser durch Strukturänderung, bzw. Oberflächenvergrößerung des Materials. Dasselbe gilt für die Herabsetzung durch Zusatz von Narkoticis.

Für eine echte Lösung in den Zellbestandteilen spricht die differentiale Gelbfärbung des Gewebes, die vor allem bei Tumorgewebe sehr ausgesprochen ist, obwohl sie auch beim normalen Gewebe sichtbar ist und gar nicht, weder mit Wasser, noch mit Alkoholäther, gänzlich auswaschbar ist. Fettgewebe wird selbstverständlich stark orangegelb angefärbt. Dieser Unterschied zwischen Tumoren und normalem Gewebe ist sehr interessant, es ist klar, daß auch in dieser Beziehung die physikalisch-chemische Differenz zwischen Tumor- und normalen Zellen hervortritt; aber es ist unter diesen Umständen wohl ausgeschlossen, aus der Gelbfärbung der Flüssigkeit auf mehr oder weniger Reduktionskraft des Gewebes schließen zu wollen.

Lipschitz hätte etappenmäßig verfolgen müssen, was sukzessive aus dem *m*-Dinitrobenzol wird, unter Inbetrachtziehung der bestehenden chemischen Möglichkeiten.

Die sekundären weiteren Veränderungen wurden schon vorher von uns angedeutet.

Fügt man dann reines *m*-Nitrophenylhydroxylamin zu normalem, bzw. zu Tumor-Gewebe, so ergibt sich folgendes:

1. Nach Hinzufügung zu jeglicher Gewebeart zeigt sich in jedem Falle eine Verringerung der Gelbfärbung.

2. In sehr bedeutendem Umfange ist das bei Tumorgewebe der Fall, ja es kommt vor, daß die ganze Flüssigkeit entfärbt wird.

Es bestehen hier zwei Möglichkeiten: erstens eine Adsorption an das Gewebe, wodurch von selbst die Gelbfärbung der äußeren Flüssigkeit herabgesetzt wird; zweitens aber die sehr wahrscheinliche Überführung

des Körpers, sei es durch Reduktion oder Oxydation, oder Kombination beider, in farblose Produkte.

Sehr instruktiv wird unseres Erachtens die physikalische Zustandsänderung des Milieus durch Bestimmung der Oberflächenspannung wiedergegeben. Wir geben hierzu einige Kurven. Man sieht, daß die Oberflächenspannung während ungefähr 3 Stunden zunimmt, aber nicht geradlinig, wie zu erwarten gewesen wäre. Nach diesem Zeitpunkt bleibt die Spannung dieselbe oder erniedrigt sich etwas, obwohl nachgewiesenermaßen lebendes Gewebe noch nach 4 Stunden Sauerstoff verbrauchen



Abb. 1.

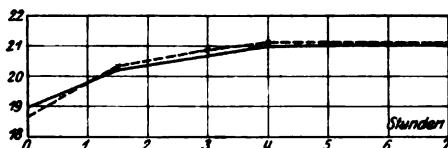


Abb. 2.

kann. Das weist darauf hin, wie es auch zu erwarten war, daß neben dem Reduktionsprozeß ein Adsorptionsprozeß einhergeht, dem wiederum pharmakologische Einwirkungen folgen. Damit wird aber, um es zu wiederholen, ganz und gar jeder kolorimetrischen Bestimmung der Boden entzogen, wenn das Zwischenprodukt nicht entfernt wird.

Die starke pharmakologische Wirksamkeit steht wohl fest; sowohl das synthetisch rein hergestellte Hydroxylaminderivat als das vom Gewebe produzierte sind für Maus und Kaninchen giftig. Merkwürdigerweise nimmt auch der vom Gewebe produzierte Körper mit der Zeit an Giftigkeit ab; weitere Umsetzungen desselben sind dafür wohl verantwortlich zu machen.

In diesem Sinne wird auch unseres Erachtens die von *Lipschitz* mitgeteilte Beobachtung verständlich. Er will den Nachweis führen, daß man lebendes Gewebe unter Totalausschluß von Sauerstoff dazu bringen kann, das Dinitrobenzol in größerem Umfange zu reduzieren. Durch Wasserstoffdurchperlung bewegungslos gemachte Spermatozoen erfahren durch Zugabe des Nitrokörpers eine kurzfristige Wiederkehr ihrer Bewegungen, um alsdann bald wieder gelähmt zu werden. Es handelt sich aber unseres Erachtens doch nicht so sehr um eine direkte

Aufhebung der H-Lähmung durch indirekte, infolge Freiwerdung von Sauerstoff aus der Nitroverbindung bewirkte Sauerstoffzufuhr, als um die Einwirkung eines narkotischen Stoffes, nämlich des entstehenden Hydroxylaminderivats, das in kleinen Dosen erregend, in großen abtötend wirkt.

In dieser Beziehung ist zu sagen, daß die gesamten Annahmen von *Lipschitz* betreffs Vertretbarkeit der gewöhnlichen O-Zehrung durch indirekten O-Verbrauch aus der Nitroverbindung doch auf schwachen Füßen stehen. Wenn unter O₂-Durchleitung weniger Gelbfärbung der Flüssigkeit auftritt, so ist doch sicher dabei zu bedenken, daß nachgewiesenerweise der Hydroxylaminabkömmling von Sauerstoff wieder oxydiert werden kann und so zu einem ungiftigen Körper wird.

Zusammenfassend wäre also folgendes zur Nitroreduktion durch lebendes Gewebe in vitro zu sagen:

1. Die Reduktion, wobei das pharmakologisch interessante m-Nitrophenylhydroxylamin entsteht, ist weiterer Erforschung wert, zumal hiermit für die Eigenart von Tumorzellen mehrere wichtige Aufschlüsse gefunden werden könnten. Dabei ist auch an die bis jetzt noch ungeklärte Verknüpfung von Nitrokörperwirkungen mit Krebsentstehung zu denken.

2. Es gibt aber noch zu viel unaufgeklärte Umstände, als daß man, wie es *Lipschitz* schon tat, an eine im Kolorimeter quantitativ bestimmbare Atmungsleistung lebender Gewebe denken könnte. Noch weniger reichen die bisherigen Ergebnisse zu einer Diskussion prinzipiell wichtiger Fragen aus, denn:

3. Die von *Lipschitz* benutzten Farbenreaktionen sind nicht dem Reduktionsprozeß, sondern beigemischten Thiophenderivaten zuzuschreiben.

4. Das Hydroxylaminderivat ist ein physikalisch-chemisch sowie pharmakologisch derart wirksamer Körper, daß an ihm eine Arbeitsleistung seitens lebender Gewebe nur schwerlich gemessen werden kann. Es müßten für die Reduktionsleistung sowie für andere reihengemäß verlaufende biochemische Prozesse die verschiedenen Etappen festgelegt werden.

Literatur.

- 1) *Warburg*, diese Zeitschr. 110, 1921/22; Denkschrift der Kaiser-Wilhelm-Akademie, 1921. — 2) *Drew*, Brit. Journ. of exper. Path. 1, 1920. — 3) *Barcroft* u. a., Journ. of Physiol. 37, 12, 1908. — 4) *Russell* und *Gye*, Brit. Journ. of exper. Path. 1, 1920. — 5) *Waterman* und *Dirken*, Archives Néerlandaises de Physiologie 5, 3, 1921. — 6) *W. Lipschitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 1920; Pflügers Arch. 191, 1921. — 7) *Neuberg* und *Welde*, diese Zeitschr. 60, 472–474, 1914. — 8) *Brand*, Ber. 88, J. pr. Ch. (2) 74, 64. — 9) Ber. 55, 882, 1922; J. pr. Ch. (2) 71, 464, 1906.

Über ein neues Reagenzglas.

Von

Julius Orient.

[Aus dem toxikologischen Institut der Universität Cluj (Klausenburg), Rumänien.]

(Eingegangen am 3. November 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

An der in der Praxis wohl bewährten Form des gewöhnlichen Reagenzglases wurde bis jetzt wenig geändert. Seit der Verbreitung der Kapillar- und Mikroanalyse werden zum Nachweise sehr kleiner Mengen irgend einer Substanz auf mikrochemischem Wege Probier-
röhren von minimaler Größe verfertigt, ohne daß ihre Gestalt wechselte, aber ohne daß sie ihrem Zwecke auch nur annähernd entsprochen hätten.

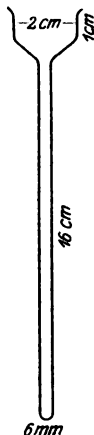


Abb. 1.

Ich konstruierte ein Probierrohr, das besonders für oben erwähnte Zwecke sowie für andere weiter unten angeführte vorteilhaft verwendbar ist. Es sind Röhren von verschiedener, 5, 10, 20 cm usw. Länge, die flach gedrückt sind und deren Schmalseite 5 bis 6 mm breit ist. Das offene Ende ist in 1 bis 2 cm Höhe trichterartig erweitert und ist hier zylindrisch. Die Probierröhren sind entweder ganz aus durchsichtigem Glas oder an einer der flachen Seiten aus Milchglas oder auch aus dunklem Glas.

Die Vorteile dieser Probierröhren gegenüber den bisher gebrauchten sind folgende:

1. Man kommt mit weniger Substanz zur Untersuchung aus und braucht weniger Reagenzien; die sichtbare Oberfläche ist dagegen größer und natürlicher.
2. Die Lichtbrechung ist viel vorteilhafter als bei den linsenartig wirkenden zylindrischen Probierröhren.
3. Ein Hintergrund aus Milchglas erlaubt bei Farbreaktionen bessere Beobachtung; der Hintergrund aus dunklem Glas ermöglicht die Wahrnehmung von Opaleszenz leichter als die zylindrischen Probier-
röhren.
4. Besonders nützlich sind sie für bakteriologische Untersuchungen, da der Nährboden und die eingepfachten Bakterien unmittelbar beobachtet werden können, bei horizontaler Lage sogar unterm Mikroskop, ohne daß wie bei Petri-Schalen ein Öffnen erforderlich ist.
5. Bei Hämolyseuntersuchungen.

Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen.

XXIII. Mitteilung¹⁾.

Kritisches über das Vorkommen der Äpfelsäure in den Pflanzen.

Von

Hartwig Franzen und Ernst Keyssner.

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.)

(Eingegangen am 7. November 1922.)

Vor einiger Zeit hat der eine von uns gemeinsam mit *Emmi Stern*²⁾ das Vorkommen reichlicher Mengen Milchsäure in den Blättern der Himbeere nachgewiesen; bei dieser Gelegenheit wurde auch die Literatur über das Vorkommen des Körpers in den Pflanzen einer kritischen Durchsicht unterzogen, wobei es sich zeigte, daß von den 14 Pflanzen, in denen diese Säure enthalten sein soll, 11 zunächst von der Liste der Milchsäure führenden gestrichen werden müssen, weil der Nachweis der Säure in unzureichender Weise geführt wurde oder der Verdacht ihrer Entstehung durch Gärung nicht von der Hand zu weisen war.

Dieses außerordentlich schlechte Ergebnis war die Veranlassung, auch Arbeiten über andere Pflanzenstoffe einer zunächst flüchtigen Durchsicht zu unterziehen; hierbei zeigte sich, daß die Verhältnisse ähnlich wie bei der Milchsäure lagen, daß in einem großen Teil der Arbeiten der Nachweis der betreffenden Stoffe in durchaus unzureichender Weise geführt war, daß es in den meisten Fällen vollkommen unsicher war, ob der betreffende Stoff in der Pflanze vorkommt oder nicht. Es wurde deshalb der Entschluß gefaßt, die Arbeiten über das Vorkommen der einzelnen Pflanzenstoffe einer genauen kritischen Durchsicht zu unterziehen, um nur die wirklich gesicherten Vorkommnisse kennen zu lernen. Wollen wir überhaupt in das chemische Geschehen der Pflanzen näher eindringen, so ist es vor allen Dingen notwendig, unsere Kenntnisse von dem Vorkommen der Pflanzenstoffe auf eine möglichst gesicherte Grundlage zu stellen. Wir müssen vor allen Dingen versuchen, die Stoffe kennen zu lernen, die in allen Pflanzen vorkommen und die ihnen daher als lebensnotwendige Reagenzien und

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **124**, 65, 1922.

²⁾ Ebendasselbst **115**, 270, 1921.

Durchgangsstoffe dienen, und sie von den Körpern unterscheiden lernen, die nur gelegentlich vorkommen und vielleicht Nebenreaktionen ihre Entstehung verdanken. Soweit sich die Sachlage bisher überblicken läßt, können wir hierüber — wenn von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen wird — noch gar nichts aussagen. Selbst unsere Kenntnisse über das Vorkommen der sogenannten Pflanzensäuren, deren allgemeine Verbreitung im Pflanzenreiche nach vorherrschender Ansicht sichergestellt sein soll, stehen, wie zuerst gezeigt werden soll, auf sehr schwachen Füßen.

Zunächst haben wir die Arbeiten über das Vorkommen der Äpfelsäure durchgesehen, weil diese Säure, nach der Menge der Zitate zu rechnen, zu den verbreitetsten Pflanzenstoffen zu gehören scheint. Im ganzen wurden 205 Arbeiten durchgesehen, nach denen in 235 höheren Pflanzen diese Säure vorhanden sein soll. Eine Reihe von Arbeiten war uns nicht zugänglich; sie sind weiter unten zusammengestellt.

Welche Anforderungen müssen nun gestellt werden, um sicher annehmen zu können, daß ein Pflanzenstoff, in unserem Falle Äpfelsäure, in einer Pflanze vorkommt? Eine selbstverständliche Forderung ist, daß rein subjektive Momente möglichst ausgeschaltet werden müssen; es ist notwendig, die Schilderung des Nachweises so zu fassen, daß der Leser sich selbst ein sicheres Urteil bilden kann, ob die angewandte Abscheidungsmethode und die benutzten Reaktionen genügen, um die Anwesenheit der Säure sicherzustellen. Von vornherein müssen deshalb die Pflanzen, von denen lediglich behauptet wird, daß sie Äpfelsäure enthalten, ohne daß irgendwelche Belege dafür angegeben sind, zunächst von der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden. Derartige Arbeiten sind recht zahlreich. Ferner sind in die Literatur eine Anzahl von Angaben über das Vorkommen von Äpfelsäure übergegangen, die Arbeiten entnommen wurden, in denen der Säuregehalt von Früchten titrimetrisch bestimmt und als Äpfelsäure in Rechnung gezogen wurde. Die in diesen Arbeiten aufgeführten Pflanzen müssen natürlich auch zunächst von der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

In einer sehr großen Reihe von Arbeiten ist versucht worden, die Anwesenheit von Äpfelsäure in Pflanzen durch quantitative Reaktionen festzustellen.

In einigen Fällen wird als genügender Grund angesehen, auf Äpfelsäure zu schließen, wenn der Extrakt oder Preßsaft mit Bleiacetatlösung einen Niederschlag gibt. Da nun aber der allergrößte Teil der bisher in Pflanzen aufgefundenen Säuren schwerlösliche Bleisalze liefert und solche natürlich außer Äpfelsäure auch anwesend sein können, so ist dieser Nachweis völlig unzureichend. Auch wenn der Bleiniederschlag bei Stehen kristallisiert, kann darin kein zureichender Nachweis der Äpfelsäure erblickt werden. Die in diesen Arbeiten erwähnten Pflanzen

müssen zunächst von der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

In einer weiteren Reihe Arbeiten wird aus dem Bleiniederschlag durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff oder Schwefelsäure die Säure dargestellt, ohne sie jedoch irgendwie zu kennzeichnen; es wird höchstens erwähnt, daß sie alle Eigenschaften der Äpfelsäure besitzt. Auch dieser Nachweis ist natürlich völlig unzureichend.

In einigen Fällen werden kalkhaltige Abscheidungen aus Pflanzenextrakten, die mit oder ohne Zusatz eines Kalksalzes eventuell durch Fällung mit Alkohol entstehen, ohne weiteren Nachweis als äpfelsaurer Kalk angesprochen. Unter den angegebenen Umständen können natürlich die Kalksalze von sehr vielen organischen Säuren ausfallen; auch diese Art des Nachweises ist völlig unzureichend.

Die weiteren Arbeiten, in denen die Kennzeichnung der Äpfelsäure auf qualitativem Wege durchgeführt wurde, haben wir etwas eingehender behandelt; wir haben die Abscheidungsmethode kurz besprochen und die angewandten Reaktionen angeführt, damit sich jeder selbst ein Urteil bilden kann, ob der Nachweis zureichend ist oder nicht. Unsere Ansicht haben wir jedesmal kurz vermerkt.

Wenn man überhaupt zugeben will, daß qualitative Reaktionen eines so zusammengesetzten Gemisches, wie es z. B. die Bleiniederschläge aus Pflanzenextrakten sind, genügen, um einen darin enthaltenen Körper zureichend zu kennzeichnen, so muß jedenfalls eine weitgehende Reinigung vorausgehen, und dann müssen eine ganze Reihe von Reaktionen übereinstimmend auf die gleiche Substanz hinweisen. Es ist eine keineswegs genügende Reaktion auf Äpfelsäure, wenn der aus dem Bleiniederschlag erhaltene Syrup in wässriger Lösung mit Calciumchloridlösung und Ammoniak erst auf Zusatz von Alkohol einen Niederschlag gibt, wenn er bei der Einwirkung von Salpetersäure Oxalsäure liefert oder beim Erhitzen ein Sublimat gibt, welches angeblich, ohne weiteren Nachweis, aus Fumarsäure und Maleinsäureanhydrid besteht usw., denn alle diese Reaktionen können natürlich auch anderen Stoffen, die wir vielleicht noch gar nicht kennen, zukommen. Wir haben es nur in vier Fällen, in denen lediglich qualitative Reaktionen benutzt wurden, als wahrscheinlich ansehen können, daß Äpfelsäure in der untersuchten Pflanze enthalten ist. Wir sind der Meinung, daß alle Nachweise von Pflanzenstoffen, die sich lediglich auf qualitative Reaktionen stützen, höchstens unter besonderen Umständen die wahrscheinliche Annahme zulassen, daß der fragliche Körper in einer Pflanze enthalten ist; zum sicheren Nachweis genügen sie keineswegs, wenigstens so lange nicht, bis wir viel besser über die Pflanzenstoffe unterrichtet sind.

Aus einer Reihe Arbeiten, die sich mit der quantitativen Bestimmung der Äpfelsäure und auch anderer Säuren in den Pflanzen befassen, sind Angaben über das Vorkommen dieser Säure in bestimmten Pflanzen in die Literatur übergegangen. Uns erscheinen diese Verfahren, bei denen lediglich aus dem Auftreten eines Niederschlags an einer bestimmten Stelle des Analysenganges auf das Vorhandensein eines Körpers geschlossen wird, zum qualitativen Nachweis eines Pflanzenstoffs in einem zusammengesetzten Gemisch absolut nicht zureichend, wenigstens so lange nicht, bis die Methoden der quantitativen Analyse solcher Gemische viel besser ausgearbeitet sind, als es bis jetzt der Fall ist. Solange wir über die qualitative Zusammensetzung der Pflanzensäfte nicht besser Bescheid wissen, muß immer mit der Wahrscheinlichkeit gerechnet werden, daß ein an der betreffenden Stelle des Analysenganges auftretender Niederschlag einem ganz anderen Stoff als dem vermuteten seine Entstehung verdankt. Wie unsicher derartige Analysengänge sein können, geht aus den Bemerkungen an den betreffenden Stellen noch besonders hervor. Wir haben deshalb auch die Pflanzen, in denen Äpfelsäure auf dem angedeuteten Wege ermittelt wurde, aus der Liste der Äpfelsäure führenden vorläufig gestrichen.

Es herrscht überhaupt eine große Neigung, die Verfahren der qualitativen und quantitativen Analyse anorganischer Stoffe auf die Untersuchung von Gemischen organischer Stoffe, wie sie z. B. in Pflanzen vorkommen, zu übertragen; im ersten Falle liegen die Verhältnisse außerordentlich viel einfacher als im letzten. Bestimmte Analysengänge zur Untersuchung so zusammengesetzter Gemische, wie sie doch sicher Pflanzenextrakte sind, lassen sich heutzutage überhaupt noch nicht aufstellen. Man wird sich zunächst damit begnügen müssen, die einzelnen Stoffe aus dem Gemisch in reinem Zustande herauszuarbeiten und sie dann durch Elementaranalysen, unterstützt durch qualitative Reaktionen, zu kennzeichnen. Auf diesem Wege ist auch das Vorkommen von Äpfelsäure in verschiedenen Pflanzen unzweifelhaft nachgewiesen worden.

Zur sicheren Kennzeichnung der Äpfelsäure darf man sich aber auch nicht mit der Metallbestimmung eines einzelnen Salzes begnügen, denn die gefundenen Werte können Zufallsergebnisse sein, wie es z. B. bei den von *Bérard* untersuchten Bleisalzen und bei den Kalksalzen aus *Crassulaceen* der Fall ist; im ersten Falle lagen sicher Gemische von äpfelsaurem Blei mit anderen Bleisalzen oder vielleicht nur andere Bleisalze vor, und im zweiten waren die Salze sicher nicht rein. Es war deshalb notwendig, auch wenn stimmende quantitative Analysen der Salze vorlagen, in manchen Fällen den Nachweis der Äpfelsäure als unzureichend anzusehen, namentlich dann, wenn das qualitative Verhalten nicht einwandfrei auf diese Säure hindeutete. Wenn der Nachweis der

Äpfelsäure und auch anderer Säuren durch Analyse von Salzen als unzweideutig angesehen werden soll, so müssen mehrere Salze analysiert und nicht nur der Metallgehalt, sondern möglichst auch die Kohlenwasserstoffwerte ermittelt werden.

Am sichersten scheint uns der Nachweis der Äpfelsäure und auch anderer Säuren dann geführt zu sein, wenn sie in Abkömmlinge von gutem Kristallisationsvermögen und scharfem Schmelzpunkt umgewandelt und dann analysiert werden. Durch die Analyse, den Schmelzpunkt, den Mischschmelzpunkt, Löslichkeit usw. läßt sich dann die Identität des betreffenden Körpers mit voller Sicherheit feststellen. Dieser Forderung genügt die Abscheidung der Säuren in Form ihrer Ester durch fraktionierte Destillation und die Umwandlung dieser in ihre Hydrazide und deren Benzylidenverbindungen.

Legt man die eben auseinandergesetzten Kriterien an, dann bleiben von den in der Literatur aufgeführten Vorkommnissen der Äpfelsäure in 235 Pflanzen nur noch die folgenden übrig:

Äpfelsäure ist wahrscheinlich nachgewiesen in:

1. *Geranium zonale* (Blätter).
2. *Gerbersumach*, *Rhus Coriaria* (Beeren).
3. *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum* (Blätter).
4. *Tabak*, *Nicotiana Tabacum* (Blätter).
5. *Rhabarber*, *Rheum undulatum* (Stengel und Blätter).
6. *Rhabarber*, *Rheum palmatum* (Stengel und Blätter).
7. *Schlehe*, *Prunus spinosa* (Früchte).
8. *Sauerkirsche*, *Prunus cerasus* (Früchte).
9. *Bryophyllum calycinum* (Blätter).
10. *Euphorbia resinifera* (Milchsaft).
11. *Opuntia versicolor* (Blätter).

Äpfelsäure ist sicher nachgewiesen in:

1. *Vogelbeere*, *Pirus Aucuparia* (Beeren).
2. *Kartoffel*, *Solanum tuberosum* (Knollen).
3. *Wermut*, *Arthemisia Absinthium* (Kraut).
4. *Zwetsche*, *Pirus domestica* (Früchte).
5. *Cerasus caproniana* (Früchte).
6. *Esche*, *Fraxinus excelsior* (Blätter).
7. *Schöllkraut*, *Chelidonium majus* (Kraut).
8. *Zuckerrübe*, *Beta vulgaris* (Rübe).
9. *Sanddorn*, *Hippophaë rhamnoides* (Beeren).
10. *Rhabarber*, *Rheum officinale* (Stengel).
11. *Zuckerahorn*, *Acer saccharinum* (Blutungssaft).
12. *Johannisbeeren*, *Ribes rubrum* (Früchte).
13. *Oxylobium parviflorum* (Kraut).
14. *Vogelkirschen*, *Prunus avium* (Früchte).
15. *Echeveria secunda glauca* (Blätter).

Das Ergebnis der kritischen Durchsicht der Literatur ist also im Falle der Äpfelsäure noch viel schlechter als in dem der Milchsäure, da

von 235 Pflanzen, in denen Äpfelsäure nachgewiesen sein soll, nur 15 übrig bleiben, in denen ihre Anwesenheit sicher ist. Es ist also durchaus nicht sichergestellt, daß diese Säure ein allgemein verbreiteter Pflanzenstoff ist.

1. Arbeiten, in denen das Vorhandensein von Äpfelsäure lediglich behauptet wird.

In einer ganzen Reihe Arbeiten wird lediglich behauptet, daß in verschiedenen Pflanzen Äpfelsäure vorkommt, ohne daß angegeben ist, wie der Nachweis geführt wurde. Mitunter findet sich sogar der Prozentgehalt an Äpfelsäure angeführt. Die in solchen Arbeiten aufgeführten Pflanzen müssen natürlich zunächst aus der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden, da eine bloße Behauptung keineswegs genügt, um die Anwesenheit dieser Säure in einer Pflanze sicherzustellen. Wie es mit der Sicherheit des Nachweises in solchen Arbeiten aussieht, mögen einige Beispiele zeigen.

1. *Müller* (Ann. d. Pharm. 25, 207, 1838) schreibt gelegentlich einer Untersuchung der *Kapuzinerkresse*, *Tropaeolum majus*: „Die Analyse wurde auf die gewöhnliche, jedem bekannte Weise angestellt . . . , weshalb man sich, da es für den Leser nur ermüdend sein kann, einer Beschreibung derselben enthält“. In 2000 Teilen der Pflanze wurden 0,125 Teile Äpfelsäure gefunden.

2. *T. Takahashi* (Bull. College Agric. Tokyo 7, 111, 1906) findet im Wein aus den Früchten der *japanischen Mispel*, *Eriobotrya japonica*, wobei „für die Analyse der anwesenden organischen Säuren die gebräuchlichen Methoden verwendet wurden“, 0,07034(!) % Äpfelsäure.

3. *Eduard Hotter* (Zeitschr. f. d. landw. Versuchswesen Österreichs 9, 747, 1906) untersuchte die chemische Zusammensetzung einer Reihe steirischer Obstfrüchte. „Hierbei diente der wässrige, filtrierte Auszug zur Ermittlung des Extrakt-, Säure-, Zucker- und Tanningehalts nach bekannten Methoden.“ Der Forscher gibt für nicht weniger als 27 Früchte den Gehalt an Äpfelsäure zahlenmäßig an.

4. *Hugo de Vries* (Bot. Ztg. 42, 337, 1884) schreibt anlässlich einer Arbeit über „Die periodische Säurebildung der Fettpflanzen“: „Die Säure der *Crassulaceen* ist, soviel ich jetzt urteilen kann, vorwiegend Äpfelsäure, und wenigstens für die Berechnung der Zahlen ist es völlig erlaubt, sie als solche zu betrachten.“

Weitere solche Arbeiten sind die folgenden:

5. *Chevallier* und *Lassaigne* (Journ. de Pharm. 4, 340, 1818):
In den Samenkörnern des *Goldregens*, *Laburnum vulgare*.
6. *Rudolph Brandes* (Repert. d. Pharm. v. *Buchner* 8, 1, 1820):
Im *Stechapfelsamen*, *Datura Stramonium*.
7. *Desfosses* (Journ. de Pharm. 7, 414, 1821):
In den Beeren des *schwarzen Nachtschattens*, *Solanum nigrum*.
8. *Feneulle* (Journ. de Chim. medicale 4, 346, 1828):
In den Wurzeln von *Asclepias vincetoxicum*.
9. *E. Soubeiran* (Journ. de Pharm. 15, 501, 1829):
In den Samen von *Jatropha curcas*.

10. *H. Wackenroder* (Magaz. d. Pharm. **33**, 144, 1831):
In den *Möhren*, *Daucus carota*.
11. *Bley* (Ann. d. Pharm. **4**, 283, 1832):
In der *levantinischen Seifenwurzel*, *Gypsophila Struthium*.
12. *Pelletier* und *Couerbe* (Ann. d. Pharm. **10**, 194, 1834):
In den *Kokelskörnern* *Menispermum Coculus*.
13. *Grossot* (Journ. d. Chim. médicale **10**, 165, 1834):
In *Bignonia catalpa*.
14. *Albert Frickhainger* (Repert. d. Pharm. v. *Buchner* (3) **7**, 1, 1851):
In den Wurzeln der *Osterluzei*, *Aristolochia Clematidis*.
15. *Adolf Weiss* und *Julius Wiesner* (Bot. Ztg. **19**, 41, 1861):
In dem Milchsafte der *Wolfsmilch*, *Euphorbia cyparissias*.
16. *A. Beyer* (Arch. d. Pharm. **181**, 201, 1867):
In den Samen der *gelben Lupine*, *Lupinus luteus*.
17. *Theodor Peckolt* (Arch. d. Pharm. **184**, 37, 1868):
In der Rinde von *Cassia speciosa*.
18. *Th. Schloesing* (C. r. **69**, 353, 1869):
In den grünen Blättern des *Tabaks*, *Nicotiana Tabacum*.
19. *Graeger* (Neues Jahrb. f. prakt. Pharm. **39**, 193, 1873):
In den *Preißelbeeren*, *Vaccinium Vitis Idaea*.
20. *Wright* und *Patterson* (Chem. News **37**, 6, 1878):
In unreifen *Maulbeeren*, *Morus nigra*.
21. *Bolland* (Journ. de Pharm. **30**, 461, 1879):
Im *Dattelpalmenwein*, *Phoenix dactylifera*.
22. *Theodor Peckolt* (The Pharm. Journ. and Transact. **10**, 343, 383, 1879/80):
In der *Frucht des Melonenbaumes*, *Carica papaya*.
23. *Flueckiger* (Pharmacognosie 1891, 3. Aufl., S. 674):
Im *roten Fingerhut*, *Digitalis purpurea*.
24. *Edwin Johanson* (Apotheker-Ztg. **6**, 370, 1891):
In den Früchten von *Pirus salicifolia*.
25. *Ludwig Weil* (Diss. Straßburg 1901):
Im Fruchtfleisch von *Acacia concinna*.
26. *Theodor Peckolt* (Ber. pharm. Ges. **18**, 347, 1903):
Im Fruchtfleisch von *Psidium Guayava*, *Psidium Araca*, *Psidium acutangulum*.
27. *Theodor Peckolt* (Ber. pharm. Ges. **19**, 31, 1909):
In den Früchten von *Acnistus cauliflorus*.
28. *A. Beythien* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **8**, 544, 1904):
Im *Himbeersaft*, *Rubus Idaeus*.
Im Saft der *Garten- und Walderdbeeren*, *Fragaria vesca*.
29. *R. Kayser* (Zeitschr. f. öffentl. Chem. **12**, 155, 1906):
Im *Himbeersaft*, *Rubus Idaeus*.
30. *David Hooper* (The pharm. Journ. (4) **27**, 161, 1908):
In den getrockneten Früchten von *Garcinia pedunculata*.
31. *Robert H. Lott* (Chem. News **99**, 169, 1909):
In den Früchten von *Viburnum nudum*.
32. *Jul. Mayer* (Zeitschr. f. öffentl. Chem. **15**, 15, 1909):
In französischen *Weißweinen*, *Vitis vinifera*.
33. *Charles R. Blake* (Chem. News **100**, 210, 1909):
In den Beeren von *Viburnum dentatum*.

34. *Ray. R. Neidig* (Chem. News **102**, 40, 1910):
In der Frucht von *Menispermum canadense*.
35. *Bouillonlagrange* (Ann. Chim. **67**, 90, 1808):
In den Stielen und Blättern von *Rheum palmatum*.
36. *Mähl* (Journ. d. Pharm. v. *Trommsdorff* **20**, (2) 29, 1811):
In der *Garten- oder Weinraute*, *Ruta graveolens*.
37. *Geiger* (Diss. Heidelberg 1818):
In der *Ringelblume*, *Calendula officinalis*.
38. *J. Habermann* (Verh. d. Naturforsch. Ver. Brünn **22**, 288, 1883):
In den Samen der *Rotbuche*, *Fagus silvatica*.
39. *H. Snyder* (Experiment Station Record **11**, 843, 1900):
In den *Tomaten*, *Solanum Lycopersicum*.
40. *Warcollier* (C. r. **158**, 973, 1914; C. 1914 (1), S. 1774):
In *Äpfelmosten*, *Pirus malus*.
41. *A. Klutschareff* (Journ. f. Landw. **61**, 161, 1913; C. 1913 (2), S. 803):
Im getrockneten *Tabak*, *Nicotiana Tabacum*.
42. *A. E. Gillette* (Chem. News **108**, 205, 1910; C. 1910 (1), S. 1754):
In den Früchten von *Viburnum lentago*.
43. *C. B. Smith* (Chem. News **107**, 266, 1913; C. 1913 (2), S. 445):
In der *Schneebeere*, *Lymphocarpus racemosus*.
44. *Karl Brauhöfer* und *Julius Zellner* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **109**, 12, 1920):
In *Sedum Telephium* (Blätter), *Sempervivum hirtum* (Rosettenblätter), *Euphorbia coerulescens* (Stammgebilde), *Opuntia monacantha* (Stammgebilde), *Aloe vera* (Blätter).
45. *E. Mach* und *K. Portele* (Landw. Vers.-Stat. **38**, 72, 1891):
In den Preiselbeeren, *Vaccinium Vitis Idaea*.
46. *J. du P. Oost Huizen* und *O. M. Scheed* (Journ. Amer. Chem. Soc. **35**, 1308, 1913):
Im *Tabak*, *Nicotiana Tabacum*.
47. *Trommsdorff* (Neues Journ. d. Pharm. v. *Trommsdorff* **24**, 13, 1832):
Im *Bitterklee*, *Menyanthes trifoliata*.
48. *Bley* (Neues Journ. d. Pharm. v. *Trommsdorff* **24**, 95, 1832):
In der *levantinischen Seifenwurzel*, *Radix Saponariae levanticae*.
49. *Biltz* (Neues Journ. d. Pharm. v. *Trommsdorff* **23**, 245, 1831):
Im Saft der Kapsel vom *weißsamigen* und *blausamigen Mohn*, *Papaver somniferum*.
50. *Bley* (Neues Journ. d. Pharm. v. *Trommsdorff* **14**, 83, 1827):
Im *Moschuskraut*, *Teucrium marum*.
51. *Leo Schiperowitsch* (Pharm. Zeitschr. f. Rußland **23**, 818, 1885):
Im eingetrockneten Saft vom *Stinklattich*, *Lactuca virosa*.
52. *W. J. Baragiola* und *Ch. Godet* (Landw. Jahrb. **47**, 249, 1914):
In den *Weintrauben*, *Vitis vinifera*.

2. Arbeiten, in denen das Vorhandensein von Äpfelsäure lediglich aus der Entstehung eines Bleiniederschlags hergeleitet wird.

In einigen Arbeiten wird auf die Anwesenheit von Äpfelsäure in Pflanzen lediglich daraus geschlossen, daß ihr wässriger Extrakt mit Bleisalzen einen Niederschlag gibt; ein derartiger Schluß ist natürlich unzulässig. Die in diesen Arbeiten, die weiter unten aufgezählt sind,

erwähnten Pflanzen müssen zunächst von der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

1. *Vauquelin* (Ann. de Chim. **84**, 127, 1800):
Im *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*.
2. *P. C. Geiger* (Schweiggers Jahrb. d. Pharm. u. Chem. **15**, 481, 1815):
Im Tränenwasser der *Reben*, *Vitis vinifera*.
3. *Leo Meier* (Berlin. Jahrb. f. d. Pharm. **28** (1), 71, 1826):
Im *Leinsamen*, *Linum usitatissimum*.
4. *Joh. Bapt. Enz* (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **5**, 196, 1856).
5. *L. Weil* (Arch. d. Pharm. **239**, 368, 1901):
In den Früchten von *Acacia concinna*.
6. *G. André* (C. r. **140**, 1708, 1905):
In der *Eispflanze*, *Mesembryanthemum cristallinum*.
7. *Vogel* (Schweiggers Journ. f. Chem. u. Phys. **20**, 412, 1818):
Im Saft der *Heidelbeeren*, *Vaccinium myrtillus*.

3. Arbeiten, in denen aus dem Auftreten eines kristallisierenden Bleiniederschlags auf die Anwesenheit von Äpfelsäure geschlossen wird.

In einigen Arbeiten wird lediglich aus dem Auftreten eines kristallisierten Bleiniederschlags beim Fällen der wässerigen Extrakte mit Bleisalzen auf die Anwesenheit von Äpfelsäure geschlossen. Auch dieser Nachweis ist völlig unzureichend, so daß die in den fraglichen Arbeiten, die weiter unten aufgezählt sind, erwähnten Pflanzen zunächst aus der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden müssen.

1. *Hubert* (Journ. de Chim. medicale **6**, 193, 1830):
In der Frucht von *Rhamnus cathartica*.
2. *A. Buchner* (Repert. d. Pharm. v. *Buchner* **94** oder (2) **45**, 184, 1847):
In den roten Rüben, *Beta vulgaris*.
3. *Joh. Bapt. Enz* (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **8**, 311, 1859):
Im Saft der *Hollunderbeeren*, *Sambucus nigra*.
4. *Joh. Bapt. Enz* (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **8**, 511, 1859):
In den Beeren des *Attichs*. *Zwergslieder*, *Sambucus Ebulus*.
5. *Karl Kresling* (Arch. d. Pharm. **229**, 389, 1891):
Im Blütenstaub der *Kiefer*, *Pinus silvestris*.
6. *E. Riegel* (Arch. d. Pharm. **111**, 161, 1850):
In den Beeren der *Myrthe*, *Myrtus communis*.

4. Arbeiten, in denen aus dem Bleiniederschlag die Säure hergestellt wird, ohne sie jedoch näher zu kennzeichnen.

In einer Reihe von Arbeiten wird der Pflanzenauszug mit Bleisalzen gefällt und der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff oder Schwefelsäure zersetzt. Über den aus dem Bleiniederschlag erhaltenen Körper ist

entweder gar nichts ausgesagt oder es ist höchstens erwähnt, daß er eine Säure ist, die alle Eigenschaften der Äpfelsäure besitzt. Auch die in diesen Arbeiten, die weiter unten aufgezählt sind, erwähnten Pflanzen müssen zunächst aus der Reihe der Äpfelsäure führenden gestrichen werden, da die Angaben zur Kennzeichnung der Äpfelsäure als solche bei weitem nicht ausreichen.

1. *Vauquelin* (Scherers allgem. Journ. d. Chem. 8, 279, 1802):
In den Absonderungen der Stengel und Blätter der *Kichererbse*.
Cicer arietinum.
2. *Robiquet* (Ann. de Chem. et de Phys. (1) 72, 143, 1809):
Im *Süßholz*, *Glycyrrhiza glabra*.
3. *Ph. L. Geiger* (Repert. f. Pharm. v. *Buchner* 15, 1, 1823):
In den grünen Blättern vom *Wolfsfuß*, *Lycopus europæus*.
4. *Ph. L. Geiger* (Magaz. d. Pharm. 8, 204, 1824; 9, 113, 1825):
Im getrockneten Kraut von *Galeopsis villosa*.
5. *H. Feneulle* (Journ. de Pharm. 11, 305, 1825):
In den Wurzeln von *Asclepias vincetoxicum*.
6. *H. Wackenroder* (Kastners Arch. f. d. ges. Naturlehre 8, 417, 1826):
In den Wurzeln des *Lerchensporns*, *Corydalis tuberosa*.
7. *Dulong* (Journ. de Pharm. 12, 110, 1826):
In der *Kichererbse*, *Cicer arietinum*.
8. *Vauquelin* (Ann. de Chim. et de Phys. (2) 41, 46, 1829):
In den Wurzeln der *Möhre*, *Daucus carota*.
9. *Joh. Barth. Trommsdorff* (Ann. d. Pharm. 10, 213, 1834):
In der *Baldrianwurzel*, *Valeriana officinalis*.
10. *L. F. Bley* (Journ. f. prakt. Chem. 6, 294, 1835):
In den *Aprikosen*, *Prunus armeniaca*.
11. *Leroy* (Journ. de Chim. medicale 16, 1, 1840):
Im *Hopfen*, *Humulus lupulus*.
12. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 5, 284, 1842):
In den Wurzeln der *Einbeere*, *Paris quadrifolius*.
13. *Heinrich Rüthausen* (Journ. f. prakt. Chem. 53, 417, 1851):
Im *Bärlapp*, *Lycopodium clavatum*.
14. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 26, 296, 1853):
Im getrockneten Kraut des *Braunwurz*, *Scrophularia nodosa*.
15. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 27, 12, 1853):
Im *Braunwurz*, *Scrophularia aquatica*.
Im *Leinkraut*, *Linaria vulgaris*.
16. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 27, 65, 1853):
In *Digitalis grandifl. lutea*.
Im *Löwenmaul*, *Antirrhinum majus*.
17. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 27, 129, 1853):
Im *Cymbelkraut*, *Linaria cymbalaria*.
18. *Joh. Bapt. Enz* (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 7, 182, 1858):
Im *Ehrenpreis*, *Veronica officinalis*.
19. *Wilh. Gintl* und *Friedr. Reinitzer* (Monatsh. f. Chem. 3, 745, 1882):
In den Blättern der *Esche*, *Fraxinus excelsior*.

5. Arbeiten, in denen kalkhaltige Abscheidungen aus Pflanzenextrakten ohne nähere Kennzeichnung als äpfelsaurer Kalk angesprochen werden.

In einigen Arbeiten werden kalkhaltige Abscheidungen aus Pflanzenextrakten, die mit oder ohne Zusatz eines Calciumsalzes eventuell durch Fällung mit Alkohol entstehen, als äpfelsaurer Kalk angesprochen. Daß derartige Abscheidungen keineswegs nur aus Calciummalat zu bestehen brauchen, was ja schon von vornherein wahrscheinlich ist, geht aus einer Arbeit von *Ch. Ordenneau* (Bull. Soc. chim. 6, 262, 1891) hervor. Der Forscher erhielt aus unreifen *Weintrauben*, *Vitis vinifera*, durch Neutralisieren des Saftes mit Calciumcarbonat rhombische Kristalle von Calciumtartrat und nadelförmige, die aus einem Doppelsalz von Calciumtartrat und Calciummalat bestanden von der Formel $C_4H_4O_6Ca \cdot C_4H_4O_5Ca \cdot 6H_2O$; der Calciumgehalt des Salzes wurde im Mittel zu 17,15 % gefunden, während sich 17,09 % berechnen. Durch teilweise Zersetzung mit Schwefelsäure wurde Calciumtartrat und Calciumbimalat erhalten. Bei der vollständigen Zersetzung mit Schwefelsäure entstanden aus dem Filtrat vom Gips beim Eindunsten blumenkohlartige, zerfließliche Kristalle. Die in diesen, weiter unten aufgeführten Arbeiten erwähnten Pflanzen müssen ebenfalls zunächst aus der Reihe der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

1. *P. A. Adet* (Crells Ann. 1800 (2), S. 191):
In dem Saft der *Ananas*, *Ananas sativus*.
2. *Vauquelin* (Ann. de Chim. et de Phys. (1) 72, 191, 1809):
Im *Gottesnadenkraut*, *Gratiola officinalis*.
3. *Payen* (Journ. de Pharm. 9, 383, (1823):
In den *Dahliaknollen*, *Dahlia variabilis*.
4. *Vauquelin* (Journ. de Pharm. 11, 49, 1825):
In der Rinde von *Solanum Pseudoquina*.
5. *Lebreton* (Journ. de Pharm. 14, 377, 1828):
In den unreifen Früchten der *Apfelsine*, *Citrus Aurantium multiflorum* und der *Pomeranze*, *Citrus Bigaradia*.
6. *A. Buchner* und *J. E. Herberger* (Repert. f. Pharm. v. *Buchner* 88, 337, 1831):
Im *moskowitischen Rhabarber*.
7. *W. A. Lampadius* (Journ. f. prakt. Chem. 6, 285, 1835):
Im *sibirischen Eisapfel*, *Pirus malus*.
8. *Franz Steer* (Sitzungsber. Wien. Akad. d. Wissensch., Math.-Naturw. Klasse 21, 383, 1856):
In den *Wachholderbeeren*, *Juniperus communis*.
9. *Thomas D. McElhenie* (Amer. Journ. of Pharm. 44, 197, 1872):
In den *Tomaten*, *Solanum Lycopersicum*.
10. *David Hooper* (The Pharm. Journ. (3) 18, 681, 1888):
In der Rinde von *Rhamnus Wigthii*.

11. *Lacona Eymard* (Journ. de Pharm. et Chim. (5) **21**, 192, 1890):
Im *japanischen Mispelbaum*, *Eriobotrya japonica*.
12. *A. Adet* (Ann. de Chim. **25**, 32, 1798):
Im Saft der *Ananas*.
13. *Hielm* (Ann. de Chim. **8**, 29, 1798):
In den *Kirschen*.

6. Arbeiten, in denen Fruchtsäuren titriert und als Äpfelsäure in Rechnung gesetzt wurden.

In die Literatur sind eine Reihe von Angaben über das Vorkommen von Äpfelsäure in Früchten übergegangen, bei deren Untersuchung der titrimetrisch ermittelte Säuregehalt als Äpfelsäure in Rechnung gezogen wurde. Die in diesen Arbeiten aufgeführten Pflanzen sind zunächst auch von der Liste der Äpfelsäure führenden zu streichen.

1. *R. Fresenius* (Ann. d. Pharm. **10**, 219, 1857):
In den Mirabellen, Süßkirschen, Pfirsichen, Trauben, Äpfeln, Zwetschen, Reineclauden, Aprikosen, Brombeeren, Sauerkirschen, Pflaumen, Heidelbeeren, Erdbeeren, Stachelbeeren, Himbeeren, Maulbeeren, Johannisbeeren.
2. *E. Lenssen* (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **3**, 966, 1870):
In den Früchten der *Berberitze*, *Berberis vulgaris*.
3. *Graeger* (Neues Jahrb. f. prakt. Pharm. **38**, 201, 1872):
In den Früchten der *Berberitze*, *Berberis vulgaris*.
4. *P. Kulisch* (Landw. Jahrb. **19**, 101, 1890):
In *Äpfel- und Birnenweinen*.
5. *Lührig, Borisch und Hepner* (Pharm. Zentralh. **49**, 869, 1908):
In *Himbeersäften*.
6. *Kochs* (Pharm. Zentralh. **50**, 585, 1909):
In *Erdbeersäften*.
7. *G. Maue* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **30**, 201 1915; C. 1915 (2), S. 1151):
Im *Fliederbeerwein*, *Sambucus nigra*.
8. *E. Feder* (Pharm. Zentralh. **53**, 1321, 1912):
In der *Rauschbeere*, *Vaccinium uliginosum*.
9. Tätigkeitsbericht des chemischen Versuchs- und Hefereinzucht-laboratoriums der k. k. höheren Lehranstalt für Wein- und Obstbau in Kloster Neuburg für 1912/13, C. 1912 (2), S. 1883):
In einer Reihe von Früchten.
10. *F. Seiler* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **27**, 243, 1914):
In *Obstweinen*.
11. *R. Otto und W. D. Kroper* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **19**, 10, 1910; C. 1910 (1), S. 884):
In den *Schlehen*, *Prunus spinosa*.
12. *R. Otto und W. D. Kroper* (Zeitschr. f. Unter. d. Nahrungs- u. Genußm. **19**, 328, 1910; C. 1910 (1), S. 1536):
In den *japanischen Quitten*, *Cydonia japonica*, *Mehlbeeren*, *Pirus Aria*, *Ebereschen*, *Pirus Aucuparia*, *Korneelkirsche*, *Cornus mas*.

7. Arbeiten, in denen versucht wurde, die aus Pflanzen abgeschiedene Säure als Äpfelsäure durch qualitative Reaktionen zu kennzeichnen.

Vauquelin (Ann. de Chim. et de Phys. (1) 71, 159, 1809) fällte den wässerigen Auszug der *Tabaksblätter*, *Nicotiana Tabacum*, mit Bleiacetat, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, behandelte das Filtrat vom Bleisulfid mit Galläpfelauszug und dampfte ein. Der kaum kristallisierende Sirup gab mit Bleiacetat eine in Essigsäure lösliche Fällung, blähte sich im Feuer unter Verbreitung von Karamelgeruch auf und gab bei der Einwirkung von Salpetersäure Oxalsäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Frommherz (Magaz. d. Pharm. 8, 35, 1824) stellte aus dem *Rainjarn*, *Tanacetum vulgare*, einen wässerigen Auszug her, fällte diesen mit Bleisalzen, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, dampfte das Filtrat vom Bleisulfid ein, extrahierte den erhaltenen Sirup mit Alkohol und verjagte ihn. Der so erhaltene Sirup konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden; er gab mit Bleiacetat einen in Salpetersäure löslichen hellgelben Niederschlag und mit Kalkwasser erst auf Zusatz von Alkohol eine Fällung.

Der Nachweis ist unzureichend.

Henry fils (Journ. de Pharm. 11, 233, 1825) gewann aus dem wässerigen Extrakt der *Yamswurzel*, *Ipomaea Batatas*, über die Bleifällung einen Sirup, dessen wässrige Lösung durch Blei- und Silbernitratlösung nicht gefällt wurde, weder Kalk- noch Barytwasser trübte und beim Verbrennen brenzlich roch.

Der Nachweis ist unzureichend.

Dessaignes (Journ. de Pharm. 25, 24, 1854) konnte aus *Rharbarber*, *Rheum rhaponticum* und *compactum*, nach der von *Berzelius* angegebenen Methode nur sehr geringe Mengen Äpfelsäure erhalten. Dagegen wurden günstige Ausbeuten an sehr reinem äpfelsauren Ammon (nähere Kennzeichnung fehlt) aus *Liguster*, *Ligustrum leviaticum*, *Studentenblume*, *Tagetes erecta*, *Mahonia Aquifolium*, *Tomaten*, *Solanum Lycopersicum*, erzielt.

Der Nachweis ist unzureichend.

Eugen Dietrich (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 15, 196, 1866) behandelte *eßbare Kastanien*, *Castanea vesca*, zunächst mit Äther, dann mit Alkohol, fällte den alkoholischen Extrakt mit Bleisalzen und erhielt aus dem Niederschlag einen sauren unkristallisierbaren Sirup, dessen wässrige Lösung mit Kalkwasser weder in der Hitze noch in der Kälte eine Trübung gab.

Der Nachweis ist unzureichend.

Friedrich Rochleder (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 8, 238, 1870) fällte den Saft der *Sauerkirschen*, *Prunus Cerasus*, *Cerasus acida*, mit Bleisalzen und erhielt einen Niederschlag der kristallin wurde, und daraus einen Sirup, der unter einer Glocke bald zu Kristallen erstarrte. Die Kristalle lösten sich fast vollständig in wasser- und alkoholhaltigem Äther; nach dem Verdunsten des letzteren hinterblieb ein stark sauer schmeckender Sirup, der im Vakuum über Schwefelsäure bald zu einer Kristallmasse erstarrte. „Alle Eigenschaften sprechen dafür, daß diese Säure Äpfelsäure sei.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Joh. Bapt. Enz (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 19, 1, 1870) erhielt aus dem wässerigen Auszug der Blütenköpfchen des *Maßliebchens*, *Bellis perennis*, mit Bleiacetat einen schmutzig grünen Niederschlag, der mit heißem Wasser behandelt wurde. Aus dem Filtrat schied sich ein kristallines Pulver aus, „welches bei näherer Untersuchung den Charakter des äpfelsauren Bleioxyds besaß“.

Der Nachweis ist unzureichend.

Otto Lietzenmayer (Diss. Erlangen, 1878, S. 59) erhielt aus dem wässerigen Extrakt des *Schöllkrauts*, *Chelidonium majus*, einen Bleiniederschlag, zersetzte diesen, neutralisierte das Filtrat vom Bleisulfid, fällte nochmals mit Bleisalzen und gewann aus dem neuen Niederschlag die freie Säure durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff. Sie war eine farblose, grobkörnige, sehr hygroskopische Kristallmasse vom Schmelzpunkt 142 bis 144°, die kein Drehungsvermögen besaß. Nach *Haitinger* (Monatsh. f. Chem. 2, 485, 1881) ist die *Lietzenmayersche* Säure im wesentlichen Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

Aubert (Revue de botanique 2, 369, 1890) gewann aus *Crassula arborescens*, *Sedum dendroicum* und *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*, durch Fällen des Saftes mit Bleiacetat und Zersetzen des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff Äpfelsäure. Die Kennzeichnung der Säure erfolgte nach einer von *Dragendorff* (*Fremy*, Encyclopédie de chimie 10) angegebenen Methode. Die Beschreibung der Versuche fehlt.

Der Nachweis ist unzureichend.

Derosne, Henry und *Payen* (Journ. de Pharm. 27, 20, 1840) dampften den wässerig-alkoholischen Auszug der *Monesiarinde*, *Lucuma glycyphloea*, ein und erhielten neben Gips ein organisches Kalksalz, aus dessen wässriger Lösung durch Bleiacetat ein weißer Niederschlag erhalten wurde, der sich teilweise in heißem Wasser löste und sich beim Erkalten in Nadeln abschied. Die aus dem Bleisalz gewonnene freie Säure war Äpfelsäure „mit den charakteristischen Eigenschaften, die diesen Körper auszeichnen“.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Voelcker (Journ. f. prakt. Chem. 48, 245, 1849) fällte den Inhalt der Schläuche von *Nepenthes* mit Bleiacetat, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und dampfte das Filtrat vom Bleisulfid ein, wobei ein kristallinischer Rückstand erhalten wurde. Aus der wässerigen Lösung fiel auf Zusatz von Calciumchloridlösung und Ammoniak zitronensaurer Kalk aus, das Filtrat von diesem gab auf Zusatz von Alkohol eine weitere Fällung. Der mit Bleiacetat erhaltene Niederschlag war in Essigsäure löslich, schmolz jedoch nicht beim Kochen mit Wasser, was auf eine Beimengung von zitronensaurem Blei zurückgeführt wird.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Clasen (Pharm. Rundschau Neuyork 8, 262, 1890) zog die Beeren von *Rhus aromatica* mit Ammoniak aus, dampfte den Auszug zur Trockne ein und extrahierte den Rückstand mit ammoniakhaltigem absoluten Alkohol. Nach dem Verdunsten des Alkohols wurde „nach Zusatz von Wasser das Bleisalz bereitet und endlich aus diesem das Calciumsalz, in welchem dann durch Darstellung von Oxalsäure mittels 60proz. Salpetersäure die Anwesenheit jener Säure (Äpfelsäure) angenommen werden konnte“.

Der Nachweis ist unzureichend.

In den weiter unten aufgezählten Arbeiten wird zum Nachweis der Äpfelsäure in der Weise verfahren, daß der wässerige Pflanzenextrakt zunächst mit Bleiacetat gefällt und der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt wird. Auf die Anwesenheit von Äpfelsäure wird geschlossen, wenn in dem Filtrat vom Bleisulfid Calciumchloridlösung oder Kalkwasser keinen Niederschlag hervorruft, ein solcher aber auf Zusatz von Alkohol auftritt. *Ein so geführter Nachweis von Äpfelsäure ist natürlich unzureichend.*

1. *Gay-Lussac* (Ann. de Chim. et de Phys. 6, 331, 1817):
Im *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*.
2. *Lassaigue* und *Feneulle* (Journ. de Pharm. 7, 548, 1821):
In den *Sennesblättern*, *Cassia angustifolia*.
3. *Morin* (Journ. de Pharm. 8, 57, 1822):
In der Rinde von *Quassia Simaruba*, *Simaruba amara*.
4. *Morin* (Journ. de Chim. médicale 1, 84, 1825):
In der Frucht von *Solanum mammosum*.
5. *Franz Jahn* (Arch. d. Pharm., 74. Bd. der ganzen Folge oder (2) 24, 28, 1840):
In den Deckblättern der *Haselnuß*, *Corylus avellana*.
6. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 7, 282, 1844; 8, 147, 209, 1844):
In den Wurzeln und Blättern von *Eschscholtzia californica*.
7. *Carl Martius* (Habilitationsschrift Erlangen 1857):
In den *Sennesblättern*, *Cassia angustifolia*.

C. W. Scheele (*Crells Annalen* 7, 29, 1785), der Entdecker der Äpfelsäure, benutzte zu ihrer Abscheidung aus Früchten anfangs das Kalksalz. Die Fruchtsäfte wurden durch Zusatz von Alkohol von Pektinstoffen befreit, das Filtrat von diesen mit Kreide neutralisiert und zum Sieden erhitzt, wobei zitronensaurer Kalk ausfiel. Das Filtrat von diesem schied auf Zusatz von starkem Alkohol ein Kalksalz ab, aus dem die Säure durch Einwirkung von Schwefelsäure gewonnen wurde. Diese Säure nannte *Scheele* Äpfelsäure, weil er sie besonders reichlich in unreifen Äpfeln auffand. Da der Forscher beobachtete, daß der so gewonnene Körper stets noch kalkhaltig war, benutzte er später zu ihrer Abscheidung das schwer lösliche Bleisalz, welches dann durch Schwefelsäure zerlegt wurde.

Als wesentlichen Unterschied der Äpfelsäure von der Citronensäure gibt *Scheele* die größere Löslichkeit des Kalksalzes der ersteren Säure und ihre Fähigkeit bei der Einwirkung von Salpetersäure Oxalsäure zu liefern an.

Daß der Forscher nach seiner Methode aus Früchten wirklich reine Äpfelsäure abscheiden konnte, dürfte sehr zweifelhaft sein; er erhielt auch immer nur einen nicht kristallisierenden Syrup. *Braconnot* (Ann. de Chim. et de Phys. 8, 149, 1818) ist der Ansicht, daß *Scheeles* Säure aus zwei Substanzen, Vogelbeerensäure und schleimiger Substanz bestand. Wie wenig die *Scheelesche* Methode geeignet ist, auch nur eine annähernd

quantitative Trennung von Äpfelsäure und Citronensäure zu erzielen, zeigen die Untersuchungen von *Hartwig Franzen* und *Eugen Schuhmacher* (Zeitschr. f. physiol. Chem. 115, 9, 1921) über die Säuren der Johannisbeeren, die nur ganz wenig Äpfelsäure und überwiegend Citronensäure enthalten, während *Scheele* in diesen Früchten annähernd gleiche Mengen der beiden Säuren auffand. *Es dürfte deshalb durchaus nicht sicher sein, daß in allen von Scheele untersuchten Früchten wirklich Äpfelsäure enthalten ist, da die benutzte Abscheidungsmethode und die Kennzeichnung der Säure unzureichend war.* Die von diesem Forscher untersuchten Früchte, die weiter unten aufgezählt sind, müssen deshalb zunächst von der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

Fast ausschließlich Äpfelsäure enthalten: *Berberitzen*, *Berberis vulgaris*, *Hollunderbeeren*, *Sambucus nigra*, *Schlehen*, *Prunus spinosa*, *Vogelbeeren*, *Pirus Aucuparia*, *Pflaumen*, *Prunus domestica*.

Zu gleichen Teilen Äpfelsäure und Citronensäure sind enthalten in den *Stachelbeeren*, *Ribes grossularia*, *Johannisbeeren* (rote, weiße, schwarze), *Ribes rubrum*, *Heidelbeeren*, *Vaccinium Myrtillus*, *Mehlbeeren*, *Crataegus aria*, *Kirschen*, *Prunus Cerasus*, *Erdbeeren*, *Fragaria vesca*, *blasse Brombeeren*, *Rubus Chamaemorus*, *Himbeeren*, *Rubus Idaeus*.

Viel Citronensäure und wenig oder gar keine Äpfelsäure enthalten *Moosbeeren*, *Vaccinium oxycoccus*, *Preißelbeeren*, *Vaccinium Vitis idaea*, *Traubenkirschen*, *Prunus Padus*, *Bittersüß*, *Solanum dulcamara*, *Hagebutten*, *Rosa canina*.

L. Cadet (Ann. de Chim. 49, 250, 1804) vergor zunächst den Saft der Früchte des *Melonenbaumes*, *Carica papaya*, neutralisierte dann mit Pottasche und fällte durch Alkohol ein Kalksalz, das die „Kennzeichen“ des Calciummalats besaß, zerfließlich war und mit Quecksilber- und Bleinitratlösung Niederschläge gab. Der Bleiniederschlag gab mit Schwefelsäure zersetzt „Äpfelsäure“.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. H. Stoltze (Berlin. Jahrb. f. Pharm. 21, 282, 1820) dampfte den wässerigen Auszug der *Ringelblume*, *Calendula officinalis*, zur Trockne ein und behandelte den Rückstand mit Wasser. Das Nichtgelöste war kalkhaltig und in Essig-, Salpeter- und Salzsäure leicht löslich. Die aus dem Kalksalz durch Zersetzen mit Schwefelsäure gewonnene Säure kristallisierte nicht und ebensowenig ihre Alkalisalze. Daraus wird geschlossen, daß Äpfelsäure vorlag.

Der Nachweis ist unzureichend.

Vauquelin (Schweiggers Jahrb. d. Chem. u. Phys. 85, 456, 1822) gewann aus der Frucht des *Boabab* durch Behandeln mit Calciumcarbonat ein Kalksalz und zersetzte dieses durch Einwirkung von Schwefelsäure. Der aus dem Filtrat vom Gips durch Eindampfen erhaltene saure zähe Sirup gab in wässriger Lösung mit Bleiacetat einen farblosen Niederschlag, der aber nicht kristallin wurde.

Der Nachweis ist unzureichend.

Avequin (Journ. de Chim. médicale 7, 467, 1831) erhielt aus der Frucht des *Advocat*, *Persea gratissima*, *Laurus Persea*, ein Kalksalz und zersetzte dieses mit Schwefelsäure; aus dem Filtrat vom Gips wurde durch Eindampfen ein Sirup erhalten, der nicht kristallisierte.

Der Nachweis ist unzureichend.

Henri Braconnot (Ann. de Chim. et de Phys. 51, 328, 1832) dampfte den aus den Blättern von *Geranium zonale* gewonnenen Preßsaft zur Sirupsdicke ein und filtrierte von ausgeschiedenem Calciumtartrat ab; aus dem Filtrat schieden sich nach einigen Tagen kalkhaltige Kristalle in Form von abgeplatteten Prismen ab. Sie wurden durch Behandlung mit Soda-lösung in die Lösung des Natriumsalzes umgewandelt und diese mit Bleiacetatlösung versetzt, wobei ein Niederschlag entstand, der beim Stehen kristallin wurde; er schmolz beim Erhitzen mit Wasser und löste sich teilweise darin auf. Durch Zersetzen des Bleiniederschlags mit Schwefelwasserstoff und Eindampfen des Filtrats vom Bleisulfid wurde die freie Säure in kugeligen Kristallaggregaten erhalten. Ihre Lösung gab mit Kalk- und Barytwasser keinen, dagegen mit Bleiacetat einen weißen Niederschlag, der beim Stehen kristallin wurde. Aus der Säure konnte auch ein kristallisierendes Zinksalz gewonnen werden. Man hat den Eindruck, daß *Braconnot* tatsächlich Äpfelsäure in Händen gehabt hat, worauf vor allen Dingen das Kristallinwerden des Bleiniederschlags und die Nicht-fällbarkeit mit Kalk- und Barytwasser hindeutet. *Man kann immerhin als wahrscheinlich annehmen, daß in dem Preßsaft von Geranium zonale Äpfelsäure enthalten ist.*

J. B. Trommsdorff (Ann. d. Chem. u. Phys. 10, 328, 1834) zog *Gerbersumach*, Beeren von *Rhus Coriaria*, wiederholt mit kochendem Wasser aus und dampfte den Extrakt ein, wobei ein Kalksalz erhalten wurde, welches durch wiederholtes Umkristallisieren gereinigt werden konnte. Das aus dem Kalksalz gewonnene kristallisierende Bleisalz lieferte eine feste Säure, die aus warzenförmig aggregierten Nadeln bestand. Aus der Säure konnten gut kristallisierende saure Ammon- und Kalksalze gewonnen werden, deren Aussehen mit den entsprechenden äpfelsauren Salzen übereinstimmte. Auch in diesem Falle hat man den Eindruck, daß *Trommsdorff* reine Äpfelsäure in Händen gehabt hat, worauf das Kristallisationsvermögen der Säure und ihres Bleisalzes und vor allen Dingen die Bildung von gut kristallisierenden sauren Ammon- und Kalksalzen hindeutet. *Es ist also immerhin wahrscheinlich, daß im Gerbersumach Äpfelsäure vorhanden ist.*

L. F. Bley (Arch. d. Pharm. 13, 248, 1828) behandelte *Himbeersaft*, *Rubus Idaeus*, mit Kreide und zog den entstandenen Niederschlag mit heißem Wasser aus, um den leichter löslichen äpfelsauren Kalk von zitronensaurem zu trennen. Die wässerige Lösung wurde entkalkt und eingedampft. „Die Flüssigkeit ward filtriert und lieferte eine gelbbraune Säure von starker Sirupkonsistenz, welche sich im Feuer stark aufblähte und unter dem Geruch gerösteten Brotes verkohlte.“ Kalkwasser gab einen flockigen, Bleiacetat einen kristallisierenden Niederschlag. Eisensalze gaben keinen Niederschlag, wurden aber durch Alkalien nicht wieder ausgefällt. Mercuronitrat gab einen weißen, in Wasser unlöslichen Niederschlag, Silbernitrat einen braunen. Zinn wurde aufgelöst; die Lösung gab aber beim Eindampfen keine Kristalle. „Hieraus scheint mir kein Zweifel obzuwalten, gedachte Säure als unreine Äpfelsäure anzusprechen.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Desrosne, Henry und *Payen* (Examen chimique et médicale du Monesia, Paris 1841) gewannen aus einem wässerig-alkoholischen Auszug der *Monesia-rinde*, *Lucuma glycyphloea*, ein Kalksalz, daraus das kristallisierende Bleisalz und weiterhin die freie Säure. „Die freie Säure zeigte die charakteristischen Eigenschaften der Äpfelsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Hermann v. Allen (Amer. Journ. of Pharm. 52, 439, 1880) erhielt aus der wässerigen Lösung des ätherischen Extrakts von *Viburnum prunifolium* mit Kalkwasser zunächst einen Niederschlag von zitronensaurem Kalk; das Filtrat ließ auf Zusatz von Alkohol einen Niederschlag fallen, in welchem äpfelsaurer Kalk vorliegen soll, weil das aus ihm hergestellte Bleisalz beim Erhitzen mit Wasser schmolz.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Belzung (Journ. de Botanique 7, 221, 1893) hält die mikroskopischen sphärischen Kristalle, welche beim Einlegen von Schnitten der Blätter von *Euphorbia caput medusae*, *Euphorbia caerulea* und *Euphorbia resinifera* in Alkohol entstehen, für äpfelsauren Kalk, weil sie sich in Wasser, nicht aber in einer gesättigten Lösung von äpfelsaurem Kalk auflösen.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Bornträger und *G. Paris* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1, 158, 1898) bestimmten die Äpfelsäure im *Granatapfel*, *Punica Granatum*, indem sie das Filtrat vom zitronensauren Kalk mit Alkohol versetzten, den Niederschlag abfiltrierten und die Asche titrierten.

Der Nachweis ist unzureichend.

Albert P. Sy (Journ. of Franklin Inst. 166, 321, 1908) untersuchte *Zuckerahornsafft*, *Acer saccharinum*, in gleicher Weise wie *A. Bornträger* und *G. Paris* den Granatapfel.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Kuhlmann (Ann. de Chim. et de Phys. 24, 225, 1823) erhielt aus dem wässerigen Auszug der *Krappwurzel*, *Rubia tinctorum*, mit Barytwasser unter Zusatz von Alkohol einen Niederschlag, der durch Auflösen in Salzsäure und Fällen mit Ammoniak gereinigt wurde. Er bestand aus einer Mischung von wenig Calciumphosphat und einem in Wasser unlöslichen Bariumsalz, „dessen Säure von organischer Art sich in ihren Eigenschaften der Äpfelsäure zu nähern schien“.

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Riegel (Arch. d. Pharm., der ganzen Folge 105. Bd. oder (2) 55, 150, 1848) gewann aus den Beeren der *wilden Rebe*, *Vitis silvestris*, durch Fällen des Saftes mit Bleisalzen einen Niederschlag, der mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde; das Filtrat vom Bleisulfid gab mit Barytwasser eine Fällung, die als äpfelsaurer Baryt angesehen wurde.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. F. Bohlig (Jahrb. f. prakt. Pharm. 3, 39, 1840) extrahierte *Hanf*, *Cannabis sativa*, und *Brennnessel*, *Urtica dioica*, mit Alkohol, sättigte den Auszug mit Magnesia, dampfte zur Trockne ein und zog den Rückstand mit Alkohol aus. Das Nichtgelöste *verhielt* sich wie äpfelsaures Magnesium.

Der Nachweis ist unzureichend.

Henri Braconnot (Ann. de Chim. et de Phys. 8, 149, 1818) gewann aus dem *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*, ein in sechsseitigen Prismen kristallisierendes Kalksalz, aus welchem über das Bleisalz die freie Säure dargestellt wurde, die eine dicke Flüssigkeit war, welche im Trocken-

schränk kugelige Kristallgruppen absetzte. Die saure Flüssigkeit gab beim Erhitzen ein Sublimat von nadelförmigen Kristallen. Eine wässrige Lösung der Säure wurde durch Blei-, Silber- und Quecksilbernitratlösung nicht gefällt; mit Bleiacetatlösung entstand aber ein kristallin werdender, beim Erhitzen mit Wasser schmelzender farbloser Niederschlag. Das Magnesium- und Zinksalz kristallisierten gut, das Natrium- und Kaliumsalz nicht. Hier hat man den Eindruck, daß *Bracconnot* reine Äpfelsäure in Händen gehabt hat, worauf die Nichtfällbarkeit der Säure durch Blei-, Silber- und Quecksilbernitratlösung, ihre Fällbarkeit durch Bleiacetatlösung, das Kristallinwerden des Bleiniederschlags sein Schmelzen beim Erhitzen mit Wasser, die gut kristallisierenden Magnesium- und Zinksalze und die nicht kristallisierten Alkalisalze hindeuten. *Es ist also wahrscheinlich, daß im Hauswurz Äpfelsäure vorhanden ist.*

L. Rabenhorst (Berlin. Jahrb. f. Pharm. 86, 99, 1836) zog den *gemeinen Gagel*, *Myrica Gale*, mit Wasser aus, neutralisierte den Extrakt mit Pottasche, dampfte zur Trockne ein und destillierte den Rückstand aus einer Glasretorte. Er erhielt ein Destillat, „was stark sauer reagierte und alle Charaktere von Äpfelsäure besaß“.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Goupil (Ann. de Chim. et de Phys. (3) 17, 503, 1846) fällte den wässrigen Auszug von *Tabakblättern*, *Nicotiana Tabacum*, mit Bleisalzen, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelsäure und gewann aus dem Filtrat vom Bleisulfat ein saures Ammonsalt, welches in rhombischen Prismen kristallisierte (Winkel der Schrägfläche $112^{\circ}30'$, der Seitenfläche 137° und $159^{\circ}25'$). Aus dem Ammonsalt wurde die freie Säure über das Bleisalt als farblose warzenförmige Kristallgruppe erhalten. Der Bleiniederschlag war zunächst flockig, wurde dann aber kristallin und verlor bei 140° drei Moleküle Kristallwasser. Das Kalium-, Natrium- und Ammonsalt kristallisierten leicht. Beim Erhitzen in der Retorte wurde ein Sublimat erhalten, welches in Wasser leicht löslich war und mit Silber- und Bleisalzen Niederschläge gab. Letzterer wurde in verdünnter Lösung kristallin und ebenso der Niederschlag mit Baryt. Aus 1 kg bei 100° getrocknetem Tabak wurden 35 bis 40 g saures äpfelsaures Ammon erhalten. Auch hier hat man wieder den Eindruck, daß *Goupil* reine Äpfelsäure in Händen gehabt hat; darauf deutet vor allen Dingen das gut kristallisierende saure Ammonsalt, der zunächst flockige, dann kristallin werdende Bleiniederschlag und sein Wassergehalt von drei Molekülen hin. *Es ist also höchst wahrscheinlich, daß im Tabak Äpfelsäure enthalten ist.*

Ferdinand Daubrava (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 8, 337, 1854) gewann aus dem wässrigen Auszug des *Hirtentäschelkrauts*, *Capsella bursa pastoris*, durch Füllen mit Bleisalzen einen Niederschlag, den er mit heißem Wasser auszog; aus dem Auszug fiel ein weißer pulveriger Körper aus, der unter Wasser schmolz und beim Erhitzen mit Schwefelsäure stechend riechende, saure Dämpfe entwickelte, die auf Maleinsäure zurückgeführt werden.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. A. Flueckiger (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 17, 82, 1868; Flückigers Pharmakognosie 1891, 3. Aufl., S. 197) erhielt aus *Euphorbium*, dem eingetrockneten Saft von *Euphorbia resinifera*, durch zweimalige Bleifällung und Zersetzen des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff einen Sirup, der sich beim Trocknen in eine körnige Masse

verwandelte. Die wässerige Lösung gab mit Calciumchlorid und Ammoniak erst auf Zusatz von Alkohol einen Niederschlag. Beim Erhitzen in der Retorte wurden Nadeln und Blättchen von Malein- und Fumarsäure erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

Hermann Block (Arch. d. Pharm. **226**, 953, 1888) stellte aus den Blättern und unreifen Früchten des *Efeus*, *Hedera helix*, einen Bleiniederschlag her, zersetzte diesen und fällte das mit Kalkwasser neutralisierte Filtrat durch Alkohol. Die aus dem Kalksalz über das Bleisalz hergestellte Säure gab bei der Sublimation Fumarsäure und Maleinsäureanhydrid.

Der Nachweis ist unzureichend.

Friedrich Oelze (Sitzungsber. d. physik.-mediz. Soc. Erlangen **22**, 17, 1890) stellte aus den Blüten und Früchten der *Preißelbeere*, *Vaccinium vitis idaea*, zunächst ein Bleisalz her, zersetzte dieses mit Schwefelsäure und ätherte das Filtrat vom Bleisulfat aus. Aus dem durch Fällung mit Bleiacetat gewonnenen Bleiniederschlag wurde eine Säure erhalten, die, im Glühröhrchen erhitzt, ein Sublimat von Maleinsäureanhydrid gab, während Fumarsäure zurückblieb.

Der Nachweis ist unzureichend.

Bernhard Börner (Diss. Erlangen 1829) verwandelte den aus den wässerigen Auszügen der Blüten von *Arnica*, *Wohlverleih*, *Arnica montana*, erhaltenen Bleiniederschlag durch Einwirkung von Sodälösung in eine Lösung der Natriumsalze, dickte diese ein und zog den Rückstand mit Alkohol aus, wobei Alkalisalze organischer Säuren in Lösung gingen. Es wurde nachgewiesen, daß Oxalsäure, Weinsäure, Citronensäure und Bernsteinsäure nicht zugegen waren. Aus den Natronsalzen konnte mit Bleiacetat ein Niederschlag erhalten werden, der beim Erhitzen mit Wasser schmolz. Die freie Säure gab bei 160 bis 170° ein Sublimat von durchsichtigen, prismatischen, in Wasser kaum löslichen Kristallen — Fumarsäure —, während sich Maleinsäure in Gestalt äußerst stechend riechender Dämpfe verflüchtigte. Die wässerige Lösung des Sublimats gab mit Silbernitrat einen weißen Niederschlag.

Der Nachweis ist unzureichend.

Bille Gram (Landwirtsch. Versuchsstat. **57**, 257, 1902) stellte aus dem Extrakt des *Fenchelpulvers*, *Foeniculum capillaceum*, durch zweimalige Bleifällung und Zersetzen des Bleiniederschlags eine Säure her. Diese gab beim Trocknen bei 100° nadelförmige und federartige Kristalle. Beim Erhitzen auf 160° trat ein stechender Geruch auf und ein Sublimat, das oben aus Maleinsäure — leicht löslich in Wasser —, unten aus Fumarsäure — schwer löslich in Wasser, federförmig verzweigte Kristalle — bestand. Das Zinksalz der Säure kristallisierte monoklin, das Bariumsalz in schmierigen Schuppen oder Krusten.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Scurti und *G. de Plato* (Staz. sperim. agr. ital. **41**, 435, 1908) stellten aus *Apfelsinensaft*, *Citrus Aurantium*, über die Bleifällung eine Säure her, die Palladiumchlorür reduzierte und deren Kupfersalz beim Erhitzen Fumarsäure gab.

Der Nachweis ist unzureichend.

In einer Reihe von Arbeiten, die weiter unten aufgezählt sind, wird so verfahren, daß die über den Bleiniederschlag erhaltene freie Säure mit Salpetersäure behandelt und aus dem Auftreten von Oxalsäure auf Äpfel-

säure geschlossen wird. *Dieser Nachweis ist natürlich unzureichend* und die in diesen Arbeiten erwähnten Pflanzen müssen zunächst aus der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

Lesant (Journ. de Pharm. 8, 509, 1822):

In den Knöllchen des eßbaren *Cyperngrases*.

F. A. Pelerin (Journ. de Pharm. 8, 425, 1822):

In den Knospen der *Schwarzpappel*, *Populus nigra*.

Bourton-Chalard (Journ. de Pharm. 8, 131, 1822):

In den Wurzeln von *Ipomoea Turpethum*, *Convolvulus Turpethum*.

Gmelin und *Bär* (Schweiggers Jahrb. d. Chem. u. Phys. 85, 1, 1822).

In der *Seidelbastrinde*, *Daphne mezereum*.

Arthur Bornträger (Zettschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 5, 145, 1902). Nach der Vorschrift von *Fresenius* (Qualitative chemische Analyse, 13. Aufl., S. 335).

In den Früchten der *Morgenländischen Dattelpflaume*, *Diospyros Lotus*, *Virginischen Dattelpflaume*, *Diospyros virginiana*, *Dattelfeige*, *Diospyros Kaki*, *Mispel*, *Mespilus germanica*, *Sorbus domestica*, *Sandbeere*, *Arbutus Unedo*, *Japanische Mispel*, *Eriobotrya japonica*, *Banane*, *Musa sapientum*.

In einigen jetzt zu besprechenden Arbeiten wird die Menge der in Früchten usw. vorhandenen Äpfelsäure quantitativ nach einem bestimmten Analysengang ermittelt, ohne daß jedoch von vornherein sichergestellt wird, daß überhaupt Äpfelsäure vorhanden ist, daß an der betreffenden Stelle des Ganges nur diese Säure auftritt. Derartige Angaben haben, so lange wir über die chemischen Bestandteile der Früchte usw. nicht ganz genau unterrichtet sind, überhaupt keine Bedeutung; sie geben uns keine sichere Auskunft darüber, ob überhaupt Äpfelsäure vorhanden ist, geschweige denn wieviel. Es ist sehr wohl möglich, daß an der betreffenden Stelle des Analysenganges ganz andere Säuren als Äpfelsäure auftreten oder daß neben dieser Säure noch andere mitbestimmt werden. Die in diesen Arbeiten erwähnten Früchte usw. müssen zunächst von der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

J. M. Albahary (Ann. d. Falsific. 5, 147, C. 1912 (1), S. 1502; C. r. 144, 1232, 1907) verfährt in folgender Weise: Der Fruchtsaft wird bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, der Rückstand fein gepulvert und zunächst im Soxhletapparat mit Chloroform ausgezogen, wodurch das Fett, der größte Teil des Farbstoffs und Alkaloide entfernt werden. Dann wird mit Äther und schließlich mit Alkohol extrahiert und so die Mengen der in freiem Zustande vorhandenen Säuren ermittelt. Zur Gewinnung der in gebundenem Zustande vorkommenden Säuren wird der extrahierte Rückstand mit verdünnter alkoholischer Salzsäure auf dem Wasserbade erwärmt, filtriert, gewaschen, das Filtrat mit Ammoniak neutralisiert und der Alkohol verjagt. Der Rückstand wird mit dem Extrakt der freien Säuren, die ebenfalls mit Ammoniak neutralisiert werden, vereinigt und das Ganze mit Bleiacetat gefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert, noch feucht 1 Stunde mit verdünnter Essigsäure auf 70° erhitzt, wobei nur das äpfelsaure Blei in Lösung geht, filtriert, neutralisiert und mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, wobei das äpfelsaure Blei vollständig ausfällt.

Nachdem die Äpfelsäure in Freiheit gesetzt ist, wird sie entweder als Kalksalz oder titrimetrisch bestimmt. Auf diese Weise wurde die Äpfelsäure in folgenden Früchten ermittelt: Äpfel, Birne, Zwetsche, Pflaume, Reinc-laude, Mirabellen, Pfirsich, Aprikose, Kirsche, Sauerkirsche, Weintraube, Erdbeere, Himbeere, Johannisbeere, Moosbeere, amerikanische Heidelbeere. Gegen diese Methode sind schwerwiegende Bedenken zu erheben. Es scheint äußerst unwahrscheinlich, daß durch Behandeln des Bleiniederschlags mit verdünnter Essigsäure bei 70° lediglich äpfelsaures Blei in Lösung geht. Wahrscheinlich ist vielmehr, daß auch ein Teil der anderen Säuren mit gelöst wird. Deshalb ist auf die quantitativen Angaben nicht der geringste Wert zu legen. Ferner wurde nicht nachgewiesen, ob überhaupt Äpfelsäure vorlag. Wie wenig Wert auf die Angaben von *Albahary* zu legen ist, geht auch daraus hervor, daß er in den Johannisbeeren erheblich mehr Äpfelsäure als Citronensäure fand, während nach den Untersuchungen von *Hartwig Franzen* und *Eugen Schuhmacher* (Zeitschr. f. physiol. Chem. 115, 9, 1921) die Menge der Citronensäure in diesen Früchten rund 47 mal so groß ist wie die der Äpfelsäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

Richard Kissling (Chem.-Ztg. 22, 1, 1898; 23, 2, 1899) bestimmte den Gehalt der *Tabakblätter*, *Nicotiana Tabacum*, an Äpfelsäure auf folgendem Wege: Der wässerige Extrakt wird ausgeäthert und die in Äther löslichen Säuren mit Barytwasser versetzt, wobei zitronensaure Baryt ausfällt, der bei 0° abfiltriert wird. Aus dem Filtrat wird das äpfelsaure Barium durch Äther-Alkohol gefällt und aus der Menge des beim Versetzen entstehenden Bariumcarbonats die Äpfelsäure berechnet. Die Methode wurde an Gemischen von Äpfelsäure und Citronensäure ausprobiert. Die Ergebnisse sind „zwar keine glänzenden, aber doch ziemlich befriedigend“.

Zum qualitativen Nachweis der Äpfelsäure ist die Methode unzureichend.

F. Muttelet (Ann. d. Falsific. 2, 383, 1909; C. 1910 (1), S. 376) benutzt ein Verfahren, welches außer auf Äpfelsäure auch auf Weinsäure und Citronensäure Rücksicht nimmt. Die von den Stielen befreiten Früchte werden zerquetscht, filtriert, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt und die Pektinstoffe abfiltriert. 25 oder 50 ccm des Filtrats werden mit n/1 KOH unter Benutzung von Phenolphthalein als Anzeiger neutralisiert, mit einer 5proz. Bariumbromidlösung in 85proz. Alkohol versetzt, mit 96proz. Alkohol auf 100 ccm aufgefüllt und durchgeschüttelt. Der Niederschlag, in welchem die Barytsalze der Äpfelsäure, Weinsäure und Citronensäure enthalten sind, wird am nächsten Tage abfiltriert und mit kleinen Mengen 75proz. Alkohol ausgewaschen. Die Barytsalze werden in wenig mit Salzsäure angesäuertem Wasser aufgenommen, das Barium mit Schwefelsäure ausgefällt, das Filtrat vom Bariumsulfat mit n/1 KOH neutralisiert, mit 1 ccm Essigsäure angesäuert, 2 ccm einer 5proz. Kaliumbromidlösung und so viel Alkohol-Äther hinzugegeben, bis eine homogene Mischung entsteht, und 48 Stunden stehen gelassen. Das Kaliumbitartrat wird dann abfiltriert, in heißem Wasser gelöst und mit n/10 KOH titriert.

Das Filtrat vom Kaliumbitartrat wird mit $\frac{1}{2}$ Volumen 96proz. Alkohol versetzt, gut durchgeschüttelt, über Nacht stehen gelassen, der Niederschlag abgesaugt, mit Alkohol 1:2 ausgewaschen, in mit Salzsäure angesäuertem Wasser gelöst, das Barium mit verdünnter Schwefelsäure gefällt und das Bariumsulfat gewogen. Sein Gewicht mit 0,548 multipliziert, gibt die Menge der Citronensäure. In dem Filtrat vom Barium-

sulfat wird die Citronensäure als Kalksalz oder besser nach der Reaktion von *Denigès* mit Quecksilber und Kaliumpermanganat nachgewiesen.

Zur Bestimmung der Äpfelsäure wird das Filtrat und die Waschflüssigkeit vom Bariumcitrat auf 30 ccm eingedampft, mit dem doppelten Volumen 96proz. Alkohol versetzt und das äpfelsaure Barium am nächsten Tage abfiltriert. Es wird in wenig verdünnter Salzsäure gelöst, das Barium durch Schwefelsäure ausgefällt und das Bariumsulfat gewogen; sein Gewicht mit 0,574 multipliziert, ergibt die Menge der Äpfelsäure. In dem Filtrat wird die Äpfelsäure durch das Bleisalz gekennzeichnet. Auf diesem Wege fand *Muttelel* Äpfelsäure in den *Sauerkirschen*, *Kirschen* und *Erdbeeren*.

Zum qualitativen Nachweis von Äpfelsäure ist die Methode unzureichend.

Rudolf Kunz (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 6, 721, 1903), *Rudolf Kunz* und *Franz Adam* (Zeitschr. d. österr. Apotheker-Ver. 44, 243, 1906; C. 1906 (1), S. 1849) verwenden zur quantitativen Bestimmung der Äpfelsäure ebenfalls ein Verfahren, welches außer auf diese Säure auch noch auf Zitronensäure und Weinsäure Rücksicht nimmt.

100 ccm Fruchtsaft werden annähernd mit Natronlauge neutralisiert, mit Bleiacetat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Natronlauge neutralisiert, auf 25 ccm eingedampft, Chlorammonium- und Chlorealciumlösung hinzugefügt und über Nacht stehen gelassen. Weinsäure scheidet sich unter diesen Umständen als Calciumtartrat aus; der Niederschlag muß aber mikroskopisch geprüft werden, da bei Anwesenheit größerer Mengen Citronensäure sich ein Teil dieser ebenfalls als Calciumsalz abscheiden kann.

Das Filtrat vom Calciumcitrat wird mit der zehnfachen Menge Alkohol versetzt, der Niederschlag nach einigen Stunden abgesaugt, mit Alkohol gewaschen, in einer Platinschale mit 10 ccm 10proz. Sodalösung zersetzt, 10 ccm 10proz. Natronlauge hinzugefügt, auf dem Wasserbade vollständig zur Trockne eingedampft und dann 2 Stunden im Trockenschrank auf 120 bis 130° erhitzt, wobei das äpfelsaure Natrium in fumarsaures Natrium übergeht. Die Salzmasse wird dann in verdünnter Salzsäure gelöst und die Lösung mit Äther ausgezogen. Ist Äpfelsäure vorhanden, so bleibt beim Verdunsten des Äthers ein Rückstand von Fumarsäure, die leicht an ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser und nach dem Umkristallisieren aus Wasser an ihrer charakteristischen Kristallform erkannt werden kann. Ist keine Äpfelsäure vorhanden, dann hinterläßt der Äther beim Verdunsten nur einen ganz geringfügigen sauren Rückstand, der sich in Wasser leicht löst.

Zum qualitativen Nachweis der Äpfelsäure ist die Methode unzureichend.

Auf diese Weise wurde Äpfelsäure in den *Heidelbeeren*, *Stachelbeeren*, *Kirschen*, *Aprikosen* und *Pflaumen* nachgewiesen.

G. Paris (Chem.-Ztg. 26, 248, 1902; C. 1902 (1), S. 1114) fällt aus dem Saft der *Erdbeeren*, *Fragaria elatior*; zunächst den zitronensauren Kalk und dann durch Zusatz von Alkohol den äpfelsauren Kalk; dieser wurde versacht und die Alkalinität des Rückstandes durch Titration ermittelt und daraus die Menge der Äpfelsäure berechnet.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Wosolsobe und *J. Zellner* (Monatsh. f. Chem. 85, 1525, 1914) untersuchten *Tabakswurzeln*, *Nicotiana Tabacum*, auf die darin enthaltenen mehrbasischen Säuren nach dem Verfahren von *Albahary* und prüften die einzelnen Niederschläge qualitativ; die Reaktion von *Denigès* trat sehr kräftig und die von *Stahre* (Zeitschr. f. analyt. Chem. 41, 177) ganz

deutlich auf; es wird geschlossen, daß Äpfelsäure und Citronensäure höchst wahrscheinlich in den Tabakwurzeln vorhanden sind.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Vogel (Gilberts Ann. 61, 230, 1819) weist zunächst darauf hin, daß Vogelbeerensäure und Äpfelsäure identisch sind; weiter wird dann die Gewinnung von Äpfelsäure mit Hilfe des Bleisalzes aus *Weichselkirschen*, *Prunus Mahaleb*, *Berberitzenbeeren*, *Berberis vulgaris*, und *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*, beschrieben. Die aus diesen Pflanzen gewonnene Säure lieferte ein kristallisiertes Bleisalz, welches unter Wasser schmolz. Die kristallisierende Säure gab beim Erhitzen ein Sublimat.

Der Nachweis ist unzureichend.

Julius Zellner (Zeitschr. f. physiol. Chem. 104, 2, 1919) befreite den aus lufttrockenen Blättern von *Agave americana* erhaltenen wässrigen Auszug durch Zusatz von Alkohol von Kohlehydraten und fügte dann Ammoniak hinzu, wodurch äpfelsaurer Kalk gefällt wurde. Aus diesem wurde über das Bleisalz die freie Säure erhalten. „Das charakteristische Verhalten des Blei- und Calciumsalzes, sowie die Bildung von Fumarsäure bei Erhitzen auf 170° lassen keinen Zweifel darüber, daß hier Äpfelsäure vorliegt.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Houton-Labillardière (Ann. de Chim. (2) 8, 214, 1818) gewann aus dem *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*, über das Kalk- und Bleisalz die freie Säure. Durch den Vergleich dieser und ihrer Kalium-, Natrium-, Ammonium-, Calcium-, Strontium-, Barium- und Bleisalze mit den analogen Körpern aus der Vogelbeerensäure wurde die Identität der beiden Körper nachgewiesen.

Nach den Angaben dürfte es wahrscheinlich sein, daß im *Hauswurz* Äpfelsäure enthalten ist.

Henry Braconnot (Ann. de Chim. 65, 277, 1808; 70, 255, 1809) fällte den Auszug einer Reihe Pflanzen mit Bleinitrat und zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff oder Schwefelsäure. Zur Kennzeichnung der so gewonnenen freien Säure diente die Löslichkeit des Bleisalzes in Essigsäure, die Schwerlöslichkeit des Kalksalzes, die sirupartige Beschaffenheit der freien Säure und bisweilen die Kristallisierbarkeit des Ammonsalzes. So wurde Äpfelsäure in folgenden Pflanzen nachgewiesen: *gelber Eisenhut*, *Aconitum Lycotomum*, *Weinraute*, *Ruta graveolens*, *Wasserdost*, *Eupatorium cannabinum*, *Bauerntabak*, *Nicotiana rustica*, *Kartoffel*, *Solanum tuberosum*, *Wunderblume*, *Mirabilis jalapa*, *Spinat*, *Spinacia oleracea*, *Kapuzinerkresse*, *Tropaeolum majus*, *Ricinus*, *Ricinus communis*, *Honigklee*, *Trifolium melilotus officinalis*, *Krapp*, *Rubia tinctorum*, *Färberwau*, *Reseda luteola*, *Staphylea pinnata*, *Zwerglieder*, *Attich*, *Sambucus Ebulus*, *Nachtkerze*, *Oenothera biennis*, *Lychnis dioica*, *Chaerophyllum silvestre*, *Actaea spicata*, *weiße Zaunrübe*, *Bryonia alba*, *Flieder*, *Syringa vulgaris*, *Geranium pratense*, *Baldrian*, *Valeriana officinalis*.

Der Nachweis ist unzureichend.

Grotthus (Schweiggers Journ. f. Chem. u. Phys. 11, 281, 1814) erhielt aus dem wässrigen Auszug des Blütenstaubs der *Tulpen*, *Tulipa Gesneriana*, auf Zusatz von Alkohol einen flockigen Niederschlag, dessen wässrige Lösung mit Bleiacetat einen in Essigsäure löslichen Niederschlag gab. Das Filtrat von den Flocken gab beim Einengen einen Sirup. Aus diesen Reaktionen wird auf die Anwesenheit von Äpfelsäure geschlossen.

Der Nachweis ist unzureichend.

Henry Braconnot (Ann. de Chim. (1) 74, 276, 1810) fällte den Saft grüner Nußschalen, *Juglans regia*, mit Bleiacetat, zerlegte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und dampfte das Filtrat vom Bleisulfid ein; dann wurde Calciumcarbonat hinzugefügt, erhitzt und filtriert; beim Eindampfen wurde eine körnige, gefärbte Masse erhalten; durch Behandeln mit kaltem Wasser löste sich der äpfelsaure Kalk; der unlösliche Teil wurde mit Schwefelsäure zersetzt und dabei eine noch durch Äpfelsäure verunreinigte Citronensäure erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Grüning (Arch. d. Pharm. 220, 594, 1882) extrahierte je 200 g der Rhizome der weißen und gelben Teichrose, *Nymphaea alba* und *lutea*, mit Wasser, fällte zunächst die Gerbsäure durch Kupferacetat aus, entfernte das Kupfer durch Schwefelwasserstoff und fällte dann mit Bleiacetat. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Natronlauge neutralisiert und mit Chlorcacium und Kalkwasser versetzt. Der verhältnismäßig große Niederschlag enthielt die Kalksalze der Weinsäure und Oxalsäure. „Das Filtrat vom Kalkniederschlag schied beim Erhitzen zitronensauren Kalk ab; die davon abfiltrierte Lösung wurde mit Alkohol fraktioniert gefällt; zuerst fiel Calciumcitrat, dann äpfelsaurer Kalk aus.“

Der Nachweis ist unzureichend.

R. Kissling (Chem.-Ztg. 23, 3, 1899) wendet zur quantitativen Bestimmung von Oxalsäure, Äpfelsäure und Citronensäure im Tabak, *Nicotiana Tabacum*, das folgende Verfahren an: der mit Schwefelsäure angesäuerte Tabak wird mit Äther extrahiert, die Säuren in Wasser aufgenommen und die Lösung mit Barytlösung titriert. Durch Zusatz von 20proz. Alkohol wird zunächst Bariumoxalat und Citrat fast vollständig ausgefällt und durch Zusatz von 70proz. Alkohol dann das Bariummalat. In einer besonderen Probe wird die Menge der Oxalsäure ermittelt. Nach *Kissling* ist diese Methode keine quantitative, jedoch eine ziemlich befriedigende. Bei Vergleichsversuchen wurden annähernd die zugesetzten Mengen der drei Säuren wiedergefunden.

Zum Nachweis der Äpfelsäure ist diese Methode unzureichend.

C. Griebel (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 19, 241, 1910) untersuchte Moosbeeren, *Vaccinium oxycoccos*, Preiselbeeren, *Vaccinium Vitis Idaea* und Kranbeeren, *Vaccinium macrocarpum*, nach der Methode von *Jørgensen* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 18, 241, 1907) und fand Äpfelsäure, aber in wesentlich geringerer Menge als Citronensäure.

Zum sicheren Nachweis von Äpfelsäure ist diese Methode unzureichend.

Arbeiten, in denen die Anwesenheit von Äpfelsäure in Pflanzen durch quantitative Analyse der Säure selbst oder ihrer Abkömmlinge festzustellen versucht wird.

Vauquelin (Ann. de Chim. et de Phys. 6, 337, 1817) unterwarf 50 Liter *Vogelbeersaft*, *Pirus Aucuparia*, zunächst der Gärung und stellte dann über das Kalk- oder Bleisalz die freie Säure her, die in Form von warzenförmigen, sehr zerfließlichen Kristallanhäufungen erhalten wurde. Beim Erhitzen gab sie ein weißes nadelförmiges Sublimat; die wässrige Lösung gab mit Kalk- und Barytwasser keinen, mit Bleiacetatlösung einen flockigen, bald kristallin werdenden Niederschlag und bei der Behandlung mit Salpetersäure Oxalsäure. Die quantitative Analyse der freien Säure führte zum Verhältnis $H_1C_2O_3$.

Der Nachweis ist unzureichend.

Henri Braconnot (Ann. de Chim. et de Phys. 6, 239, 1817) gewann aus unreifen *Vogelbeeren*, *Pirus Aucuparia*, über das Kalk- und Bleisalz die „Vogelbeerensäure“. Sie selbst und ihre Alkalisalze, mit Ausnahme des sauren Ammonsalzes, konnten nicht kristallisiert erhalten werden. Die Analyse einer Reihe von Salzen gab Werte, die von den berechneten beträchtlich abwichen.

Der Nachweis ist unzureichend.

Bérard (Ann. de Chim. et de Phys. (2) 16, 225, 1821) bestimmte die Äpfelsäure in den *Aprikosen*, *Johannisbeeren*, *Kirschen*, *Pflaumen*, *Pfirsichen*, *Birnen* auf folgendem Wege: 100 g von Schalen und Kernen befreite Früchte wurden zerquetscht, abgepreßt, der Preßrückstand mit warmem Wasser ausgezogen, der Saft 1 Stunde zum Sieden erhitzt, die abgeschiedenen Flocken abfiltriert, das Filtrat zur Sirupdicke eingedampft und der Rückstand bei 70° getrocknet. Die Masse wurde dann mit 40grädigem siedenden Alkohol behandelt, von den Gummistoffen abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand nochmals in gleicher Weise behandelt. Dann wurde in Wasser gelöst, mit Kali neutralisiert und mit Bleinitrat gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen, getrocknet, gewogen und als äpfelsaures Blei in Rechnung gezogen. In den Bleiniederschlägen wurde der Basengehalt zu 66,74 % gefunden, während sich für $C_4H_4O_5Pb$ 66,13 % PbO berechnen. Wenn die Übereinstimmung auch nicht schlecht ist, so müssen in den Bleiniederschlag natürlich auch Citronensäure, die in den Johannisbeeren z. B. in überwiegender Menge vorhanden ist, Weinsäure usw. hineingehen, so daß die Übereinstimmung nur eine zufällige sein kann.

Der Nachweis ist unzureichend.

Just. Liebig (Ann. de Chim. et de Phys. 43, 259, 1830; Ann. d. Chem. 5, 141, 1833; Poggendorffs Ann. 28, 195, 1833) stellte aus *Vogelbeerensaft*, *Pirus Aucuparia*, mit Hilfe des Bleiniederschlags Äpfelsäure her und gewann aus dieser verschiedene Salze. Die Kohlenwasserstoffwerte der Säure selbst stimmen mit den berechneten sehr gut überein, ebenso die Silberwerte des Silbersalzes; weniger gute Werte lieferte das Bariumsalz und schlechte das Zink- und Magnesiumsalz. *Die Analysen genügen jedoch vollständig, um sicherzustellen, daß in den Vogelbeeren Äpfelsäure enthalten ist.*

F. L. Winkler und *J. E. Herberger* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 2, 201, 1839) gewannen beim Eindampfen des mit Hausenblase geklärten Saftes aus Stengeln und Blättern des *Rhabarbers*, *Rheum undulatum* und *Rheum palmatum*, eine braune kristalline Masse, die nach wiederholtem Umkristallisieren rein weiße, unregelmäßige Kristalle bildeten. Sie waren in Wasser ziemlich leicht löslich, in absolutem Alkohol kaum und nicht zerfließlich. Es lag wahrscheinlich saures Kaliummalat vor. Aus der wässerigen Lösung des Salzes wurde durch Silbernitratlösung ein weißer Niederschlag erhalten, dessen Silbergehalt mit dem für äpfelsaures Silber berechneten übereinstimmte. Aus dem sauren Kaliumsalz wurde über das Bleisalz die freie Säure gewonnen; sie bildete hygroskopische säulige Kriställchen, die sich „durch ihr Verhalten gegen Ammoniak, Kalkwasser usw. als reinste Äpfelsäure kundgaben“. *Die Silberbestimmung allein genügt nicht, um die Natur der fraglichen Säure als Äpfelsäure sicherzustellen; da das qualitative Verhalten der Säure nicht näher geschildert ist, kann nur mit Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß im Rhabarber Äpfelsäure enthalten ist.*

Fr. Hlisch (Ann. d. Chem. u. Pharm. 51, 246, 1844) gewann aus *Kartoffelknollen*, *Solanum tuberosum*, in der üblichen Weise über den Blei-

niederschlag eine wässrige Lösung der Säuren und fällte diese nochmals mit Bleiacetat. Die nach dem Zersetzen des Bleiniederschlags mit Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung wurde durch Zusatz von Kalkmilch von Phosphorsäure und ein Teil der Lösung nach dem Ansäuern mit Salpetersäure durch Zusatz von Silbernitratlösung von Chlorionen befreit. Auf Zusatz von Ammoniak fiel dann ein weißer Niederschlag von äpfelsaurem Silber aus, der bei 100° getrocknet wurde. Ein weiterer Teil wurde nach Beseitigung des phosphorsauren Kalks gekocht, wobei sich äpfelsaurer Kalk abschied. Die beiden Salze wurden der Analyse unterworfen (Metall- und Kohlenwasserstoffbestimmung) und mit den berechneten übereinstimmende Werte erhalten. *Es ist also sicher, daß in den Kartoffelnknollen Äpfelsäure enthalten ist.*

E. Luck (Ann. d. Chem. 54, 112, 1845) fällte den wässerigen Auszug von getrocknetem *Wermutkraut*, *Artemisia Absinthium*, mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, befreite das Filtrat von Kalk- und Magnesiumsalzen und auch von Phosphaten, fällte wieder mit Bleiacetat und zerlegte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Aus dem Filtrat vom Bleisulfid wurde durch Einwirkung von Kupferoxyd ein gummiartiges Kupfersalz gewonnen, welches wiederum mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Kupfersulfid wurde zur Sirupdicke eingengt und mit Äther ausgezogen, wobei nur ein geringer kalkhaltiger Rückstand ungelöst blieb. Die nach dem Verdunsten des Äthers erhaltene Säure gab in wässriger Lösung mit Calciumchloridlösung erst auf Zusatz von Alkohol einen Niederschlag. Der Bleiniederschlag schmolz beim Erhitzen mit Wasser und kristallisierte aus der erkaltenden Lösung in Nadeln und Blättchen. Die Analysen des Silber- und Bleisalzes (Metall- und Kohlenwasserstoffbestimmung) gaben auf Silbermalat und Bleimalat + 3 Wasser stimmende Werte. *Es ist also sicher, daß im Wermutkraut Äpfelsäure enthalten ist.*

A. Chodnew (Ann. d. Chem. 53, 283, 1845) gewann aus unreifen *Zwetschen*, *Pirus domestica*, einen kristallisierenden Bleiniederschlag, daraus schön kristallisierendes äpfelsaures Ammon und auch das Silbersalz. Die Analysen des Silbersalzes (Metall- und Kohlenwasserstoffbestimmung) stimmen mit den für äpfelsaures Silber berechneten überein. In gleicher Weise wurde aus unreifen *Stachelbeeren*, *Ribes Grossularia*, Äpfelsäure hergestellt; Analysen sind jedoch in diesem Falle nicht angegeben. *Es ist also sicher, daß in den Zwetschen Äpfelsäure vorhanden ist, während ihr Nachweis für Stachelbeeren unzureichend ist.*

H. Schwarz (Ann. de Chem. 84, 83, 1852) erhielt aus dem Saft unreifer *Trauben*, *Vitis vinifera*, durch Kalkmilch körnige Kristalle, die durch Einwirkung von Salpetersäure in das saure Salz umgewandelt wurden. Die Kalkbestimmungen stimmen wohl mit dem von Schwarz für die Formel $2(\text{CaO} - \text{Ma}) \cdot 5 \text{aq}$ berechneten Werte überein, sind aber doppelt so hoch, als sich für sauren äpfelsauren Kalk + 6 Wasser berechnen.

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Bertagnini (Il nuovo cimento 2, 306, 1855) gewann aus dem Saft der Früchte von *Cerasus caproniana* mit Kalkmilch äpfelsauren Kalk und daraus durch Einwirkung von Salpetersäure saures äpfelsaures Calcium. Der mit Bleiacetat erhaltene Niederschlag zeigte die Eigenschaften des Bleimalats. Die Analysen des Bleisalzes (Blei- und Kohlenwasserstoffbestimmung) gaben gut auf $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_5\text{Pb} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ stimmende Werte und die

des sauren Calciumsalzes (Calcium- und Wasserbestimmung) gute Zahlen für $(C_4H_4O_6)_2Ca \cdot 6 H_2O$.

In den Früchten von Cerasus caproniana ist also Äpfelsäure enthalten.

Tichanowitch (Krit. Zeitschr. f. Chem. 8, 197, 1863) zog Wermutblätter, Artemisia Absinthium, mit Alkohol aus, fällte mit Bleiacetat, zersetzte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, engte das Filtrat vom Bleisulfid ein und ätherte den Rückstand aus. Durch wiederholtes Fällen des Ätherlöslichen mit Bleiacetat wurde eine Reinigung versucht und schließlich das saure Ammonsalz gewonnen, welches trotz Umkristallisieren nicht rein war. Das Bleisalz schmolz beim Erhitzen mit Wasser und kristallisierte beim Erkalten aus. Die Bleibestimmung gab keine guten Werte.

Der Nachweis ist unzureichend.

Carl Schreiner (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 5, 207, 1856) stellte aus Schlehen-saft, Prunus spinosa, ein Bleisalz her, das aus Essigsäure umkristallisiert wurde. Blei- und Wasserbestimmung gaben nach Schreiners Berechnung Werte, die auf äpfelsaures Blei + 2 Wasser stimmten. Die Analyse des bei 145° getrockneten Salzes (Kohlenwasserstoffbestimmung) gab auf äpfelsaures Blei sehr gut stimmende Werte. Da die Analyse eines einzelnen Salzes, namentlich des Bleisalzes, nicht ausreichend ist, um die Äpfelsäure sicher zu kennzeichnen, kann nur als wahrscheinlich angenommen werden, daß in den Schlehen Äpfelsäure enthalten ist.

Friedr. Ginl (Sitzungsber. Wien. Akad. d. Wiss., math.-naturw. Klasse 59 (2), 51, 1869) extrahierte getrocknete Blätter der Esche, Fraxinus excelsior, mit Wasser, fällte den Auszug in der Kälte mit Bleiacetat, zog den Niederschlag mit heißer 5proz. Essigsäure aus und zerlegte das beim Erkalten ausfallende Bleisalz mit Schwefelwasserstoff. Das zur Sirupdicke eingedampfte Filtrat vom Bleisulfid wurde mit Alkohol aufgenommen, der Alkohol verjagt und aus dem Rückstand nach dem Lösen in Wasser und Abfiltrieren von harzigen Ausscheidungen das saure Ammonsalz hergestellt, welches umkristallisiert wurde. Aus diesem wurde über das Bleisalz die freie Säure erhalten, die über Schwefelsäure im Vakuum nach längerer Zeit zu einem nahezu festen krümeligen Kristallkuchen erstarrte. Durch Aufnehmen in Äther und Verdunstenlassen des letzteren wurde die Äpfelsäure vollkommen rein erhalten. 35 Pfund getrocknete Blätter gaben 15 g Äpfelsäure, deren Schmelzpunkt bei 85 bis $85,5^\circ$ lag; ihre wässrige Lösung drehte die Polarisationssebene; beim Erhitzen auf 150° wurde Fumarsäure erhalten. Die Analysen der freien Säure, des Silber-, Blei-, Barium-, Calcium- und sauren Ammonsalzes gaben mit den berechneten gut übereinstimmende Werte. Es ist also sicher, daß in den Blättern der Esche Äpfelsäure enthalten ist.

H. Ritthausen (Jahrb. f. prakt. Chem. (2) 2, 339, 1870) gewann aus dem Extrakt der Samen der gelben Lupine, Lupinus luteus, durch Fällen mit Bleiacetat oder Calciumchlorid Niederschläge, die durch erneutes Fällen oder Umkristallisieren gereinigt wurden. Die aus den Salzen gewonnene freie Säure war farblos und kristallisierte beim Stehen über Schwefelsäure in glänzenden, zu Gruppen vereinigten Säulen; sie war optisch inaktiv. Die Analysen des Blei- und Calciumsalzes (Metall- und Kohlenwasserstoffbestimmung) gaben Werte, die auf die Formeln $C_4H_4O_6Pb$ bzw. $C_4H_4O_6Ca$ gut stimmten. Wenn auch die Analysen der Salze gut stimmende Werte gaben, so erscheint es doch zweifelhaft, ob Ritthausen wirklich reine Äpfelsäure in Händen gehabt hat, da die angewandte Rei-

nigungsmethode nicht ganz ausreichend erscheint und es versäumt wurde, die Säure durch qualitative Reaktionen näher zu kennzeichnen. Bedenklich erscheint vor allen Dingen die optische Inaktivität der Säure.

Der Nachweis ist unzureichend.

Friedr. Rochleder (Jahrb. f. prakt. Chem. (2) 1, 436, 1870) erhielt aus dem Saft der *Sauerkirschen*, *Prunus cerasus*, *Cerasus acida*, durch Fällen mit Bleiacetat einen kristallisierenden Niederschlag; die aus diesem gewonnene Säure erstarrte beim Stehen über Schwefelsäure kristallinisch. „Alle Eigenschaften sprachen dafür, daß diese Säure Äpfelsäure sei. Zum Überfluß wurde noch eine Analyse derselben ausgeführt.“ Die eine Kohlenwasserstoffbestimmung gab sehr gute auf Äpfelsäure stimmende Werte. Da nur eine Analyse der freien Säure ausgeführt wurde und die qualitativen Eigenschaften der Säure nicht angegeben sind, kann das Vorkommen der Äpfelsäure in den *Sauerkirschen* nicht als vollständig sicher angenommen werden; es ist nur wahrscheinlich.

Adolf Mayer (Landw. Vers.-Stat. 21, 298, 1878) erhielt aus verdunkelten und belichteten Blättern von *Bryophyllum calicinum* und *Crassula arborescens* durch Versetzen des Saftes mit Alkohol ein Kalksalz, welches durch wiederholtes Lösen in Wasser und Wiederausfällen mit Alkohol gereinigt wurde. Aus diesem wurde noch das Blei- und Silbersalz gewonnen und auch die freie Säure hergestellt. Da das Bleisalz und das saure Calciumsalz nicht kristallisierten und die freie Säure ebenfalls nicht zur Kristallisation zu bringen war und in wässriger Lösung nach rechts drehte, wurde angenommen, daß eine isomere Äpfelsäure vorlag (Crassulaceenäpfelsäure). Die Analysen des Kalksalzes (Kalk- und Wasserstoffbestimmung), des Bleisalzes (Bleibestimmung) und des Silbersalzes (Silber- und Kohlenwasserstoffbestimmung) gaben die berechneten Werte.

Die von *Adolf Mayer* angewandte Isolierungs- und Reinigungsmethode des Kalksalzes genügt keineswegs, um sicher reinen äpfelsauren Kalk zu erhalten. Wenn die Analysen auch befriedigende Werte gaben, so kann dies auf einem Zufall beruhen. Bedenklich ist, daß weder die freie Säure, noch das Kalksalz zur Kristallisation zu bringen war. Man gewinnt jedenfalls aus der Arbeit nicht die Überzeugung, daß der Forscher reine Äpfelsäure und ihre Salze in Händen gehabt hat.

Der Nachweis ist unzureichend.

Ludwig Haitinger (Monatsh. f. Chem. 2, 485, 1881) weist durch quantitative Analysen nach, daß die von *Lietzenmayer* (Diss. Erlangen, 1878) aus dem *Schöllkraut*, *Chelidonium majus*, gewonnene Säure im wesentlichen aus Citronensäure besteht. Neben dieser konnte Äpfelsäure in Form ihres Kalksalzes gefaßt werden. Die freie Säure kristallisierte in strahlig gruppierten Nadeln, die bei 100° schmolzen und optisch aktiv waren ($\alpha_D = 3,66^\circ$). Die Analysen des Magnesiumsalzes (Wasser- und Magnesiumbestimmung) gaben gut auf äpfelsaures Magnesium + 5 Wasser stimmende Werte. Es dürfte wohl sicher sein, daß im *Schöllkraut* Äpfelsäure enthalten ist.

Ernst Schmidt (Arch. d. Pharm. 224, 535, 1886) erhielt aus dem Saft der Dunkelpflanzen von *Bryophyllum calycinum*, durch Zusatz von Alkohol ein Kalksalz, welches durch Umkristallisieren aus verdünnter Salpetersäure ein saures Calciumsalz lieferte; seine Analyse (Ca-Bestimmung) gab die für sauren äpfelsauren Kalk berechneten Werte. Aus den Tagpflanzen von *Bryophyllum* und von *Sempervivum* konnte auf die gleiche Weise kein kristallisierendes saures Calciumsalz gewonnen werden. Über das Bleisalz und das kristallisierende saure Ammonsalz wurde das Silbersalz gewonnen,

welches 20,3 % Wasser enthielt, was einem äpfelsauren Silber + 5 Wasser entspricht. Die Analyse des bei 100° getrockneten Salzes (Silber- und Kohlenwasserstoffbestimmung) gab auf äpfelsaures Silber gut stimmende Werte. Unter den bei 170° auftretenden Zersetzungsprodukten war Fumarsäure nicht nachzuweisen. Aus der Arbeit gewinnt man den Eindruck, daß *Ernst Schmidt* in dem aus der Tagpflanze von *Bryophyllum* gewonnenen Calciumsalz wahrscheinlich Calciummalat in Händen gehabt hat, weil er durch Einwirkung von Salpetersäure ein kristallisierendes saures Salz gewinnen konnte, welches den berechneten Calciumgehalt aufwies. Anders liegt die Sache aber bei den beiden Nachtpflanzen. Die stimmenden Analysen können Zufall sein. Bedenklich ist, daß kein kristallisierendes saures Calciumsalz erhalten werden konnte, ferner der hohe Wassergehalt des Silbersalzes und das Nichtauftreten von Fumarsäure unter den Zersetzungsprodukten beim Erhitzen. *Der Nachweis, daß in letzterem Falle Äpfelsäure vorlag, ist also unzureichend, während man mit Wahrscheinlichkeit annehmen kann, daß in den Dunkelpflanzen von Bryophyllum Äpfelsäure enthalten ist.*

G. Henke (Arch. d. Pharm. 224, 729, 1886) extrahierte den eingetrockneten Milchsaft von *Euphorbia resinifera*, sogenanntes Euphorbium, zunächst mit Petroläther, dann mit Alkohol und zuletzt mit angesäuertem Wasser. Nach Zugabe von Schwefelsäure wurde mit Äther extrahiert und der Äther verdunstet, wobei ein stark saurer Sirup erhalten wurde, der bei längerem Stehen über Schwefelsäure zu einer körnigen gelben Substanz eintrocknete. Durch Behandeln mit Tierkohle wurde der Körper farblos erhalten und schmolz dann bei 100°. Die wässrige Lösung gab mit Calciumchloridlösung und Ammoniak erst auf Zusatz von Alkohol einen Niederschlag. Bei der Analyse des Calciumsalzes (Calciumbestimmung) ist anscheinend ein Irrtum unterlaufen. Aus den angegebenen Analysendaten berechnet sich ein Calciumgehalt von 22,20 % (ber. 22,29 %), während 13,01 % (ber. 13,61 %) angegeben sind. *Aus den Angaben geht mit Wahrscheinlichkeit hervor, daß in Euphorbia resinifera Äpfelsäure enthalten ist.* Ferner wird angegeben, daß auch in *Euphorbia Cattinandro*, *Euphorbia Tirucalli*, *Euphorbia tetragona* und *Euphorbia antiquorum* Äpfelsäure enthalten ist.

In einer Reihe von Euphorbiaarten wird auch noch mikroskopisch ein Nachweis von Äpfelsäure in der Weise versucht, daß der Saft eingedunstet und die abgeschiedenen Kristalle mit Petroläther behandelt werden, wobei sie zum Teil löslich sind. Die in Petroläther nicht löslichen waren in Wasser löslich und zeigten die Kristallformen des Calciummalats.

In den folgenden Euphorbiaarten wurde auf die eine oder andere Weise Äpfelsäure mehr oder weniger reichlich gefunden: *Eu. Lathyrus*, *Eu. Myrsinites*, *Eu. orientalis*, *Eu. virgata*, *Eu. Lagascae*, *Eu. humifusa*, *Eu. splendens*, *Eu. canariensis*, *Eu. trigona*, *Eu. neriifolia*, *Eu. virosa*, *Eu. palustris*, *Eu. Gerardiana*, *Eu. verrucosa*, *Eu. exigua*, *Eu. Cyparissias*.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edmund O. v. Lippmann (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 24, 3299, 1891) konnte aus bei der Zuckerfabrikation aus *Beta vulgaris* erhaltenen Kalkniederschlägen durch Zersetzen mit Schwefelsäure, Fällen mit Bleiacetat oder Aufnehmen des neutralen Ammonsalzes mit 97proz. Alkohol reine Äpfelsäure in büschelförmigen Kristallen erhalten. Schmelzpunkt gegen 100°. $\alpha_D = -1,96^\circ$. Die Analysen des Kalksalzes (Calcium- und Wasserbestimmung) und des Silbersalzes (Silberbestimmung) gaben die für diese

Salze berechneten Werte. *Es dürfte sicher sein, daß in der Zuckerrübe Äpfelsäure enthalten ist.*

J. H. Aberson (Ber. d. deutsch. chem. Ges. **31**, 1432, 1898) stellte aus verschiedenen Crassulaceen: *Bryophyllum calycinum*, *Echeveria secunda glauca*, *Cotyledon*, *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum*, *Sedum purpurescens* und *Mauerpfeffer*, *Sedum acre*, über die Bleifällung die Säure der Crassulaceen, zwecks Studium der sogenannten Crassulaceenäpfelsäure, dar. Die erhaltene Säure zeigte von der gewöhnlichen Äpfelsäure Abweichungen im Verhalten; die Analysen verschiedener Derivate gaben die für Äpfelsäurederivate verlangten Zahlen. Da man aber aus der Arbeit nicht ersehen kann, auf die Äpfelsäure welcher Pflanzen sich die Analysen beziehen, müssen die weiter oben aufgeführten Crassulaceen zunächst aus der Liste der Äpfelsäure führenden gestrichen werden.

Der Nachweis ist unzureichend.

Salomon Frankfurt (Landw. Vers.-Stat. **48**, 167, 1894) extrahierte etiolierte Keimpflanzen der *Sonnenblume*, *Helianthus annuus*, mit Wasser, fällte den Auszug mit Mercurinitrat, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, neutralisierte das Filtrat vom Quecksilbersulfid mit Ammoniak und dunstete über Schwefelsäure ein. Hierbei fiel zunächst Asparagin, dann Glutamin aus. Die Mutterlaugen dunsteten bei weiterem Stehen über Schwefelsäure zu einem Kristallbrei von äpfelsaurem Ammon ein. Aus den angegebenen qualitativen Reaktionen ist zu ersehen, daß das Präparat auch nach mehrmaligem Umkristallisieren nicht ganz rein war. Das Silbersalz zeigte den für äpfelsaures Silber berechneten Silbergehalt. Da der stimmende Silberwert Zufall sein kann und das qualitative Verhalten des Ammonsalzes nicht einwandfrei war, muß der Nachweis als unzureichend angesehen werden.

Der Nachweis ist unzureichend.

Paul Metzger (Diss. München 1896) fällte den wässerigen Auszug von *Eichenholz*, *Quercus robur*, mit Bleiacetat, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und fällte aus dem Filtrat durch Kalkwasser und Calciumchloridlösung Weinsäure und Oxalsäure aus. Aus dem Filtrat von dem Niederschlag wurde durch Zusatz von Alkohol ein Kalksalz erhalten, aus dem über das Bleisalz eine weiße kristalline Masse gewonnen wurde, die beim Erhitzen im Rohre ein weißes Sublimat bildete. Der Silberwert des Silbersalzes stimmt auf äpfelsaures Silber. Die Silberbestimmung allein genügt nicht, um die Säure zu kennzeichnen.

Der Nachweis ist unzureichend.

H. Erdmann (Ber. d. deutsch. chem. Ges. **32**, 335, 1899) erhielt aus dem Saft der reifen Beeren des *Sanddorns*, *Hippophaë rhamnoides*, durch Neutralisieren mit Kreide ein Calciumsalz, dessen Calciumgehalt auf ein Calciummalat + 1,5 Wasser stimmte. Zur Kennzeichnung wurde die freie Säure durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure in Cumalinsäure umgewandelt, die durch ihren Schmelzpunkt, 200°, durch Überführung in Cumalinsäuremethylester, Cumalamidsäuremethylester und Oxynicotinsäure überführt wurde. *Es dürfte sicher sein, daß in den Beeren des Sanddorns Äpfelsäure enthalten ist.*

N. Castoro (Landw. Vers.-St. **56**, 423, 1902) gewann aus dem Saft der *Rharbarberstengel*, *Rheum officinale*, durch Zusatz von Strontiumhydratlösung äpfelsaures Strontium, welches nach mehrmaligem Umkristallisieren nadelförmige Kristalle, bisweilen auch Blättchen bildete, die in kaltem Wasser schwer löslich waren. Mit Bleiacetatlösung wurde

ein beim Erwärmen schmelzender, beim Erkalten kristallisierender Niederschlag erhalten. Die freie Säure kristallisierte allmählich in glänzenden, zu Büscheln vereinigten Nadeln, die bei 99 bis 100° schmolzen. Die Drehung einer 3,6proz. Lösung war $\alpha_D = -5,76^\circ$. Wasser- und Strontiumbestimmungen des Strontiumsalzes gaben gut auf äpfelsaures Strontium + 4 Wasser stimmende Werte. Das bei 100° getrocknete Zinksalz gab für äpfelsaures Zink gut stimmende Werte. *Es dürfte sicher sein, daß in den Stengeln des Rhabarbers Äpfelsäure enthalten ist.*

H. Euler und I. Bolin (Zeitschr. f. physik. Chem. 69, 194, 1909) erhielten aus dem Preßsaft von frischen, von Stengeln befreiten *Luzernepflanzen*, *Medicago sativa*, durch Fälln mit Alkohol Kalksalze, die durch Erwärmen mit Bariumcarbonat in Bariumsalze umgewandelt wurden. „In dem schwer löslichen Anteil war außer Mesoxalsäure Äpfelsäure vorhanden, deren Bariumsalz sich in Krusten am Boden des Kristallisationsgefäßes ausschied.“ Da die Menge zum Umkristallisieren nicht ausreichte, wurde nur eine Bariumbestimmung ausgeführt, die jedoch zu niedrige Werte gab.

Der Nachweis ist unzureichend.

W. H. Warren (C. 1911 (2), S. 1118; Journ. Amer. Chem. Soc. 33, 1205, 1911) empfiehlt zur Darstellung von Äpfelsäure Sugarsand aus Ahornsafft. Das aus diesem gewonnene, mehrfach umkristallisierte saure Kalksalz enthielt 9,66% Ca (ber. 9,61%). Die daraus gewonnene freie Äpfelsäure bildete eine schneeweiße kristalline Masse. Aus diesen Angaben folgt, daß im *Zuckerahornsafft*, *Acer saccharinum*, *wahrscheinlich Äpfelsäure enthalten ist.*

Edmund O. v. Lippmann (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 47, 3094, 1917) erhielt aus den kalkhaltigen Rückständen von der Zuckerdarstellung aus *Zuckerahornsafft*, *Acer saccharinum*, Äpfelsäure in weißen, ziemlich zerfließlichen Nadelchen, die gegen 100° schmolzen. $\alpha_D = -3,1^\circ$. Die Kohlenwasserstoffbestimmung gab die für Äpfelsäure berechneten Werte. Auch die Silberbestimmung des Silbersalzes und die Calcium- und Wasserbestimmung des sauren Calciumsalzes waren in guter Übereinstimmung mit den berechneten Werten. *Es dürfte sicher sein, daß im Zuckerahornsafft Äpfelsäure enthalten ist.*

Hartwig Franzen und Eugen Schuhmacher (Zeitschr. f. physiol. Chem. 115, 9, 1921) fällten *Johannisbeersafft*, *Ribes rubrum*, mit Bleiacetat, zerlegten den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, veresterten das so gewonnene Gemisch der freien Säuren mit Äthylalkohol und unterwarfen das Estergemisch der fraktionierten Destillation. Aus den zwischen 125 bis 140° siedenden Fraktionen konnte durch Einwirkung von Hydrazinhydrat Äpfelsäuredihydrazid von dem in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt 177 bis 179° und dem berechneten Stickstoffgehalt erhalten werden. Auch die aus dem Hydrazid gewonnene Benzylidenverbindung zeigte den von Curtius und von Hofe angegebenen Schmelzpunkt 164°. *Es dürfte sicher sein, daß im Johannisbeersafft Äpfelsäure enthalten ist.*

Von A. H. Spöhr (diese Zeitschr. 57, 95, 1913; C. 1914 (1), S. 158) wurde der ausgepreßte Saft von *Opuntia versicolor* mit überschüssigem gepulverten Calciumcarbonat versetzt, rasch zum Sieden erhitzt, das Gemisch bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis es neutral war, und dann filtriert. Aus dem Filtrat kristallisierte beim Einengen äpfelsaurer Kalk, welcher durch zweimaliges Umkristallisieren gereinigt wurde. Eine Kalkbestimmung gab einen gut auf äpfelsauren Kalk stimmenden Wert.

Eine einzige Kalkbestimmung genügt keinesfalls, um äpfelsauren Kalk sicher zu kennzeichnen. *Es kann höchstens als wahrscheinlich angenommen werden, daß in Opuntia versicolor Äpfelsäure vorhanden ist.*

E. A. Mann und W. H. Ince (Proc. Roy. Soc. 79, 485, 1907) erhielten aus dem wässerigen Auszug von gepulvertem *Oxylobium parviflorum* einen Bleiniederschlag und daraus durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff eine Flüssigkeit, welche mit Silber- und Bleisalzen in der Kälte einen Niederschlag gab, mit Calciumsalzen aber erst beim Kochen. Nach Entfernung der Schleimstoffe wurden hygroskopische Kristalle erhalten, welche bei 100° schmolzen. Die Elementaranalyse der freien Säure und die Kalkbestimmung im Kalksalz gaben auf Äpfelsäure bzw. äpfelsauren Kalk gut stimmende Werte.

Es dürfte also sicher sein, daß in Oxylobium parviflorum Äpfelsäure enthalten ist.

Hartwig Franzen und Fritz Helwert (Zeitschr. f. physiol. Chem. 122, 46, 1922) und Hartwig Franzen und Rudolf Ostertag (Zeitschr. f. physiol. Chem. 122, 263, 1922) fällten den Saft der Vogelkirschen, *Prunus avium*, und den Preßsaft der Blätter von *Echeveria secunda glauca* mit Bleiacetat, zerlegten den Bleiniederschlag, verwandelten die Säuren in die Ester, fraktionierten diese und führten die einzelnen Fraktionen in die Hydrazide bzw. deren Benzylidenverbindungen über. Äpfelsäuredihydrazid wurde in beiden Fällen sicher aufgefunden und durch seine Eigenschaften und die Elementaranalyse gekennzeichnet.

Es ist sicher, daß im Saft der Vogelkirschen und in den Blättern von Echeveria secunda glauca Äpfelsäure enthalten ist.

Literatur, die uns nicht zugänglich war.

Thoms Ann. 5, 109 (?), Proust. — Ann. Chim. Pharm. 54, 178, 1834, Pelletier und Couerbe; 72, 428, 1859, Braconnot. — Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Pharm. 1886, S. 14, Brunner und Chouard. — Journ. d. Pharm. f. z. Ärzte von Trommsdorff (1) 7, 390; (1) 8, 63, Biltz; 14, 145, 1828, Beetz und Ludwig; 18, 3, 1826, Trommsdorff. — L'Orosi Giornale di Chimica etc. 14, 297, 1891, Mussi. — Arch. d. Pharm. 19, 80, 1826, Brandes; 30, 247, 1829, Posselt und Reimann; 40, 69, 1834, Bley; 41, 123, 1835, derselbe; 42, 43, 1835, derselbe; 71, 238 (?) Buchner; 39, 153, 1844, Köhnke; 105, 257 (?), Bley und Diesel. — Abhandl. Naturforsch. Ges. Halle 16, 393, 1886, Knaus. — Giorn. di Farm. 1831, S. 55, Cenedella. — Amer. Journ. of Pharm. 52, 129 (?), Slocum; 1890, S. 216, Willy und Maxwell; 1891, S. 477, Tielke; 67, 387, 1895, Sayne; 85, 398, 1913, Krämer. — Zeitschr. d. allgem. österr. Apothekervereins 1876, S. 382, Semenoff; 1878, S. 173, Hanauseck; 43, 797, 1903, Adam; 43, 749, 1903, Kunz; 59, 792, 1905, Adam. — Pharm. Zeitschr. f. Rußland 21, 631, 1882, Dragendorff. — Württembergisches Correspondenzblatt 1834, 104, Zeller. — Nouvell. Remed. 1885, S. 195, Huchard. — L'Union Pharm. 1904, S. 393, Altan. — Chem. and Drug. 1885, S. 313, Reunie. — Journ. Agr. Research. 7, 269, 1916, Ridgeway. — Bull. Sci. Pharm. 15, 444, 1908, Artault de Vevey. — Ber. pharm. Ges. 19, 332, 1909, Lenz. — Journ. Ind. and Eng. Chem. 6, 301, 1914, Snell und Lochhead. — Pharm. Journ. 1889, S. 273, Naylor und Chaplin. — Militär-Med. Journ. St. Petersburg 154, Nov., 1, 1885, Both. — Journ. de Pharm. 1849, S. 349, Lenoble. — Mededeelingen van Proefstation vor de Java Suikerindustrie 1914, S. 601, L. G. Langguth Steurbald und T. van der Linden.

Zusammenfassung.

Bei einer kritischen Durchsicht der Literatur zeigt sich, daß die allgemein verbreitete Ansicht, Äpfelsäure sei als ein im Pflanzenreich weit verbreiteter Körper nachgewiesen, nicht haltbar ist. Wahrscheinlich ist Äpfelsäure nachgewiesen in folgenden Pflanzen: 1. *Geranium zonale* (Blätter). 2. *Gerbersumach*, *Rhus Coriaria* (Beeren). 3. *Hauswurz*, *Sempervivum tectorum* (Blätter). 4. *Tabak*, *Nicotiana Tabacum* (Blätter). 5. *Rhabarber*, *Rheum undulatum* (Stengel und Blätter). 6. *Rhabarber*, *Rheum palmatum* (Stengel und Blätter). 7. *Schlehe*, *Prunus spinosa* (Früchte). 8. *Sauerkirsche*, *Prunus cerasus* (Früchte). 9. *Bryophyllum calycinum* (Blätter). 10. *Euphorbia resinifera* (Milchsaft). 11. *Opuntia versicolor* (Blätter); und sicher in den folgenden: 1. *Vogelbeere*, *Pirus Aucuparia* (Beeren). 2. *Kartoffel*, *Solanum tuberosum* (Knollen). 3. *Wermut*, *Artemisia Absinthium* (Kraut). 4. *Zwetsche*, *Pirus domestica* (Früchte). 5. *Cerasus caproniana* (Früchte). 6. *Esche*, *Fraxinus excelsior* (Blätter). 7. *Schöllkraut*, *Chelidonium majus* (Kraut). 8. *Zuckerrübe*, *Beta vulgaris* (Rübe). 9. *Sanddorn*, *Hippophae rhamnoides* (Beeren). 10. *Rhabarber*, *Rheum officinale* (Stengel). 11. *Zuckerahorn*, *Acer saccharinum* (Blutungssaft). 12. *Johannisbeeren*, *Ribes rubrum* (Früchte). 13. *Oxylobium parviflorum* (Kraut). 14. *Vogelkirschen*, *Prunus avium* (Früchte). 15. *Echeveria secunda glauca* (Blätter).

Über den Einfluß von Dextrinen auf die Kristallisation von Maltose.

Von

L. de Hoop und M. J. van Tussenbroek.

(Aus dem Institut für chemische Technologie der Technischen Hochschule Delft.)

(Eingegangen am 9. November 1922.)

Bei den bis heute in der Literatur angegebenen Darstellungsweisen von Maltose wird zur Erlangung von gut kristallisierenden Produkten eine Extraktion des maltosehaltigen Sirups mit Alkohol angewendet¹⁾. Aus diesem Maltosedextringemisch wird dann die Maltose herausgelöst, während die in Alkohol unlöslichen dextrinartigen Stoffe zurückbleiben. Ohne diese Alkoholextraktion ist es bis nun nicht gelungen, den genannten Maltosesirup zur unmittelbaren Kristallisation zu bringen. Es wäre von großer technischer Bedeutung, wenn es gelänge, diese unmittelbare Kristallisation zu erzielen, und es ist daher nicht zu verwundern, daß verschiedene neuere Untersuchungen sich mit dieser Frage beschäftigt haben.

Die ersten Versuche in dieser Richtung sind nacheinander von den französischen Chemikern *Cuisinier* und *Effront* angestellt worden²⁾. Beide konnten jedoch keine Ergebnisse verzeichnen.

Auf Grund ihrer Untersuchungen haben *Maquenne* und *Roux* getrachtet, den Vollständigkeitsgrad der diastatischen Umsetzung bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen zu ermitteln. Sie behaupten, nachgewiesen zu haben, daß unter bestimmten Umständen die Reaktion:



quantitativ in der Maltoserichtung verlaufen kann³⁾. Als Beweis hierfür führen sie an, daß es ihnen gelungen ist, mehr als 100 % Maltose im Reaktionsprodukt *analytisch* nachzuweisen. Unmittelbar kristallisierende Sirupe erhalten sie hierbei jedoch nicht.

Die einzigen Untersuchungen, die etwas Positives in dieser Richtung ergeben haben, sind die von *Falch*⁴⁾, der unter bestimmten Bedingungen

¹⁾ *Soxhlet*, Journ. f. prakt. Chem. (2) 21, 276, 1880; *Herzfeld*, Ann. 220, 211, 1883.

²⁾ *Cuisinier*, Jahresber. d. Chem. 1884, S. 803.

³⁾ *Maquenne* und *Roux*, C. r. 142, 124ff., 1906.

⁴⁾ *Falch*, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 48, 281, 289, 296, 306, 1920.

derartige unmittelbar kristallisierende Sirupe erhalten zu können angibt; gleichwohl ist er selbst der Meinung, daß seiner Methode noch keine technische Bedeutung zugesprochen werden kann.

Bei der Überprüfung seiner Arbeitsmethode jedoch ist es uns nicht gelungen, praktische Ergebnisse zu erhalten, so daß wir geneigt sind, seine einigermaßen optimistischen Auffassungen als voreilig zu betrachten.

Es ist natürlich möglich, zu versuchen, auf dem von *Effront* eingeschlagenen Wege weiter zu gehen und für die diastatische Umsetzung derart günstige Bedingungen zu schaffen, daß ein genügender Reinheitsgrad der Endprodukte erreicht wird, um diese zur unmittelbaren Kristallisation zu bringen; in dieser Richtung haben wir denn auch eine Reihe von Untersuchungen ausgeführt, worauf wir jedoch erst später zurückzukommen gedenken.

Bei diesen Untersuchungen haben wir natürlich erwogen, inwieweit die erwähnte unmittelbare Kristallisation des Maltosesirups theoretisch möglich ist, und dies ist denn auch der Leitgedanke bei den zu berichtenden Untersuchungen gewesen. Diese betrafen hier mehr den speziellen Einfluß, den Dextrine auf die Kristallisation der Maltose ausüben. Wir können hierbei sofort zwei scharf unterschiedene Meinungen einander gegenüberstellen.

Die erste Gruppe von Forschern, die hauptsächlich in Frankreich vertreten ist, behauptet, daß es möglich sei, die *quantitative* Umsetzung von Stärke in Maltose durchzuführen und selbstredend also kristallisationshemmende Nebenprodukte auszuschalten. Diese Ansicht wurde, wie schon erwähnt, zuerst von *Maquenne* und *Roux* ausgesprochen¹⁾. In einer früher erschienenen Abhandlung hat einer von uns schon dargelegt, daß, wenn es gelänge, diesen quantitativen Abbau nach *Maquenne* und *Roux* nachzumachen, das Stärkeabbauproblem endgültig gelöst wäre²⁾.

Nach der zweiten Auffassung, die gegenwärtig vor allem in Deutschland und Schweden die meisten Anhänger hat, gibt es im allgemeinen keinen Beweis für diesen von *Maquenne* und *Roux* angenommenen quantitativen Abbau³⁾.

Beide Gruppen nehmen an, daß der Abbau in zwei Perioden verläuft, einer Hauptverzuckerungs- und einer Nachverzuckerungsperiode; die erste mit einem genau untersuchten physikalisch-chemischen Verlauf; die letztere ist noch nicht genau untersucht worden, jedoch ist bekannt, daß sie um vieles langsamer vor sich geht als die Hauptverzuckerungsperiode. Die erste Periode soll nach den neuesten Untersuchungen nur zu einer 75proz. Umsetzung führen, während die zweite Periode allein nach den Anhängern von *Maquennes* Theorie über 100 Gew.-Proz. Maltose geben soll.

Wir werden uns vorläufig hierin für keine Partei entscheiden, obwohl wir, solange es uns nicht gelungen ist, die quantitative Maltosebildung selbst zu erhalten, mehr zu der zweiten als zu der ersten Auffassung neigen; um so mehr als bei einigem Nachdenken klar wird, daß

¹⁾ *Maquenne* und *Roux*, l. c.

²⁾ *L. de Hoop*, Chem. Weekblad 19, 106, 1922.

³⁾ *Euler* und *Svanberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 112, 193, 1920; *Luers* und *Wasmund*, Fermentforschung 5, 169—235, 1922.

die analytisch erhaltenen Ergebnisse von *Maquenne* und *Roux* niemals richtig sein können. Haben doch diese Forscher als Kriterium für die Umsetzung das Reduktionsvermögen des Endsirups in bezug auf *Fehlingsche* Lösung gewählt, wobei das Kupfer nach *Bertrand* bestimmt wurde.

Es ist nun ohne weiteres klar, daß diese Reduktionszahl in dem komplizierten Gemisch von Kohlehydraten, das in dem Sirup anwesend ist, niemals ein richtiges Bild der Maltosebildung geben kann, so daß die Zahlen von *Maquenne* und *Roux* für den Maltosegehalt nur relativen, aber keinen absoluten Wert haben. Mit Recht sagt dann auch, unserer Meinung nach, *Pringsheim*¹⁾, daß die gegenwärtigen Auffassungen²⁾ von der Konstitution der Stärke sich in keiner Weise auf diese Untersuchungen stützen dürfen. Das Auffinden eines anderen analytischen Kriteriums scheint überdies sehr schwierig zu sein, wir haben bis heute in der Literatur keinerlei Andeutung in dieser Richtung finden können. Das auf der Hand liegende Kombinieren von Reduktion mit Polarisation führt nach eigener Erfahrung auch nicht zu positiven Ergebnissen; solange der Mechanismus der Abbaureaktion nicht aufgeklärt ist, kann man aus den gefundenen Zahlen doch nicht den wirklichen Maltosegehalt berechnen.

Wir haben ebensowenig ein analytisches Kriterium dafür auffinden können, wir haben als Kennzeichen ausschließlich Gebrauch gemacht von dem Kristallisieren oder Nichtkristallisieren der erhaltenen Sirupe. Hiermit war nun auch gleichzeitig der Vorteil verbunden, daß die technische Wichtigkeit des Abbauproblems, wie wir dies schon im Anfang darlegten, nicht aus dem Auge verloren wurde. Wir haben dabei vorausgesetzt, daß, wenn das Endprodukt der Reaktion einen genügenden Reinheitsgrad besitzt, unmittelbare Kristallisation möglich sein muß. Diese Voraussetzung stützt sich darauf, daß, wenn wir reine Maltose von *Merck* oder die für bakteriologische Zwecke hergestellte Maltose R. A. L., die uns durch die „Etablissements Kuhlmann“ in Paris freundlichst zur Verfügung gestellt wurde, in Wasser auflösten, und die Lösung zu einem Sirup eindampften, dieser Sirup binnen einiger Stunden vollständig auskristallisierte. Dasselbe war der Fall mit der in unserem Laboratorium hergestellten Maltose, die durch die schon genannte Alkoholextraktion des Maltosesirups erhalten worden war.

Wir haben nun die verschiedenen Faktoren untersucht, die bei den Endprodukten des diastatischen Abbaues kristallisationshemmend wirken können. Diese lassen sich unserer Meinung nach in einige Gruppen einteilen, und zwar:

¹⁾ *Pringsheim*, Zeitschr. f. angew. Chem. 85, 345, 1922.

²⁾ *Karrer* u. a., Helv. Chim. Acta 3, 620, 1920; 4, 185, 249, 263, 678, 811, 1921; 5, 129, 1922.

1. Dextrine und dextrinartige Stoffe, einschließlich die wenig bekannte Isomaltose.

2. Organische Stickstoffverbindungen: Eiweißstoffe und ihre Abbauprodukte.

3. Anorganische Verbindungen.

4. Eventuell vorhandene Zucker von niedrigem Molekulargewicht, z. B. Hexosen (Glucose).

Den unter 3. genannten Einfluß anorganischer Verbindungen haben wir bis jetzt noch nicht eingehend untersucht. Eine Untersuchung in diesem Sinne ist auch nicht einfach, wenn man die große Anzahl Kombinationen bedenkt, in welchen diese Verbindungen auftreten können.

Wir haben bloß festgestellt, daß Phosphate, die aus der Stärke herrühren können, in jenen Mengen, wie sie dem Aschegehalt des Sirups gemäß darin vorkommen können, nicht kristallisationshemmend wirken.

Es ist jedoch wohl merkwürdig, daß bei der Extraktion des Sirups mit 80 bis 90 % Alkohol, worin zweifellos ein beträchtlicher Teil dieser anorganischen Verbindungen in Lösung geht, gut kristallisierende Produkte erhalten werden, so daß wir geneigt wären, den Einfluß dieser Art von Verbindungen nicht für sehr beträchtlich anzusehen.

Den unter 4. angeführten Einfluß von Zuckern mit niedrigem Molekulargewicht haben wir, soweit es Glucose betrifft, experimentell untersucht. Wir fanden, daß ein Gemisch von 95 % Maltose und 5 % Glucose, wovon beide Bestandteile für sich allein gut kristallisierten, ebenfalls gute Kristallisation gab. Da mehr als 5 % Glucose auf Grund früherer Literaturangaben bestimmt nicht erwartet werden kann, glauben wir feststellen zu dürfen, daß wir auch diesen vierten Faktor ausschalten können.

Wir haben nun untersucht, inwieweit organische Stickstoffverbindungen kristallisationshemmend wirken können. Wir haben dazu Gemische von Maltose mit Eiweißstoffen und Abbauprodukte von Eiweißstoffen gemacht. Beim Zufügen von 5 % getrocknetem Hühner-eiweiß war von einem kristallisationshemmenden Einfluß nichts zu bemerken. Zusatz von Eiweißabbauprodukten ergab ebensowenig eine Beeinflussung. Versuche wurden ausgeführt mit 4 % Pepton, α -Glutaminsäure, Asparaginsäure und Glykokoll.

Hiermit glauben wir die wichtigsten Nebenumstände in Rechnung gezogen zu haben und wir kommen nun zu unseren Versuchen mit den Dextrinen, die nach allen Literaturangaben den eigentlichen kristallisationshemmenden Faktor bilden sollen. Bevor wir jedoch zu einer Besprechung dieser Versuche übergehen können, müssen wir erst einiges über die Kristallisationshemmung selbst mitteilen. Wenn man eine

3proz. Lösung von löslicher Stärke in Wasser während einiger Zeit mit einem aktiven Malzpräparat (wir nahmen hierfür immer das sogenannte Diastafor von *Hauser* und *Swobodka* in Wien) unter Hinzufügung von HF zur Erreichung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration bei 50 bis 60° vorverzuckert und die vorverzuckerte Lösung unter Hinzufügung neuer Diastase während mehrerer Tage der Zimmertemperatur aussetzt, gelingt es, nach dem Eindampfen einen Sirup zu erhalten, der nach Impfen mit einem Maltosekristall eine gewisse Neigung zur Kristallisation zeigt. Durch Zentrifugieren kann man jedoch keine Kristalle abscheiden, und ebensowenig gelingt es, unter einem Mikroskop Aufschluß über die Art des Produktes zu erhalten. Wir haben diesen Zustand in Übereinstimmung mit einer durch *Pictet* für andere kohlenhydratartige Körper eingeführte Benennung „semikristallin“ genannt.

Wir haben nun getrachtet, ausgehend von Maltose, synthetisch einen derartigen semikristallinen Zustand zu rekonstruieren. Wir haben dazu Gemische von Maltose mit verschiedenen Sorten von Dextrinen gemacht. Hierfür standen zu unserer Verfügung: Dextrinum puriss. von *Merck*, verschiedene Sorten von Handelsdextrinen von *Merck* und *Kahlbaum*, neben selbstbereiteten diastatischen Dextrinen. Diese waren erhalten worden, indem wir Stärke auf die gewöhnliche Weise abbauten, die Dextrine mit Alkohol ausfällten; wieder auflösten und durch wiederholte Fällung mit Alkohol reinigten. Wir müssen hierbei natürlich im Auge behalten, daß diese Dextrine zweifellos nicht ganz und gar identisch sind mit den Dextrinen, die beim diastatischen Abbau die Kristallisationshemmung verursachen sollen. Diese letzteren färben nämlich Jod nicht mehr, während unsere Dextrine alle mit Jod noch eine starke Rotfärbung gaben.

Wir haben nun Gemische gemacht von Maltose mit 1, 5, 10, 15 und 20% von verschiedenen dieser Dextrine, das Gemisch in Wasser aufgelöst und im Vakuum zu einem dicken Sirup eingedampft und geimpft. Wir fanden nun, daß alle diese Sirupe ziemlich rasch kristallisierten und daß die Kristallisationen in allen Fällen binnen 24 Stunden vollständig beendet waren. Von dem Auftreten des genannten semikristallinen Zustandes war keine Rede; jeder Sirup gab eine grobkörnige kristalline Masse.

Wir haben dann auch noch getrachtet, diesen semikristallinen Zustand auf andere Weise zu erhalten. Wir haben dazu Gemische gemacht von Lävoglucosan, das wir nach der Methode von *Amé Pictet*¹⁾ dargestellt haben durch Destillation von Stärke unter vermindertem Druck, mit Maltose. Auch hier erhielten wir selbst bei zwanzigprozentigem Zusatz noch rasche Kristallisation.

¹⁾ *Amé Pictet*, *Helv. Chim. Acta* **1**, 87, 1918.

Nr.	Zusammensetzung des Gemisches	o/o der Beimischung	Kristallisation
12	5 g Maltose	—	gleich
14	5 g Maltose 0,01 g Dextrin (puriss. <i>Merck</i>)	+ 0,2	Kristallisation innerhalb einer Stunde
15	5 g Maltose 0,1 g Dextrin	+ 2	Kristallisation binnen 24 Stunden
16	5 g Maltose 0,25 g Dextrin	+ 5	"
18	5 g Maltose 0,3 g Dextrin	+ 6	"
19	5 g Maltose 0,5 g Dextrin	+ 10	"
20	4 g Maltose 1 g Dextrin	20	"
23	4,5 g Maltose 0,5 g Dextrin (diastatisches, Lab. f. chem. Techn.)	10	"
25	4 g Maltose 1 g Dextrin (diastatisches)	20	vollständig innerhalb 24 Stunden
17	5 g Maltose 0,25 g Glukose	+ 5	"
22	5 g Maltose Spuren Hühnereiweiß .	—	Kristallisation fängt gleich an
21	5 g Maltose 0,05 g Hühnereiweiß .	1	"
29	2,4 g Maltose 0,1 g α -Glutaminsäure .	4	Kristallisation im An- fange ein wenig ver- zögert, aber in 24 Stun- den beendet
30	2,4 g Maltose 0,1 g Asparaginsäure .	4	"
32	2,4 g Maltose 0,1 g Glykokoll	4	"
31	2,4 g Maltose 0,1 g Pepton	4	"
26	20 g Maltose 0,5 g Lävoglukosan . .	20	sehr rasch
39	1,0 g Maltose 0,1 g Diamylose (v. <i>Pringsheim</i>)	+ 10	"
28	2,0 g Maltose 0,25 g Lävoglukosan . . 0,25 g Dextrin (diastatisches)	—	beträchtlich verzögert

Am Schluß haben wir auch Gemische gemacht von Maltose mit einem der sogenannten kristallisierenden Dextrine von *Schardinger*, der Diamylose, die uns durch *Pringsheim* freundlichst zur Verfügung gestellt worden war. Merkwürdigerweise erhielten wir auch hier keine Kristallisationsstörung.

Besprechen wir nun in kurzem die Ergebnisse dieser Untersuchung. Man wird zweifellos gut daran tun, diese Beobachtungen ebenso wie so viele andere auf dem Gebiet der Stärkechemie mit dem nötigen Vorbehalt aufzunehmen. Wir selbst betrachten nämlich die erhaltenen Ergebnisse im allgemeinen nicht als endgiltige. Wir halten das Gebiet der Stärkechemie für viel zu verwickelt, um darin vorläufig mit einiger Sicherheit wertvolle Ergebnisse verzeichnen zu können, und sind davon überzeugt, daß die große Verwirrung, die gerade in diesem Zweige der Chemie herrscht, zu einem nicht geringen Teil zahllosen, viel zu voreilig gezogenen Schlüssen zuzuschreiben ist. Die Aufgabe des Chemikers, der sich auf dieses Gebiet begibt, kann vorderhand noch keine andere sein als das Feststellen experimenteller Tatsachen.

Wir wollten mit dieser Untersuchung nur darauf hinweisen, daß die Ursache der Kristallisationsverzögerungen, die wir oben besprochen haben, im allgemeinen noch nicht aufgeklärt ist, und daß es als voreilig betrachtet werden kann, sie ohne weiteres den Dextrinen zuzuschreiben.

Blutgasanalysen. XII.

Wirkungen des konstanten und faradischen Stromes auf heterogene Systeme.

Von

H. Straub und Klothilde Meier.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 10. November 1922.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die praktisch bedeutungsvolle Frage, ob es zulässig ist, das Massenwirkungsgesetz in seiner einfachen Form auf heterogene Systeme anzuwenden, ist in letzter Zeit mehrfach erörtert worden. Daß die Verhältnisse durch die Koexistenz mehrerer Phasen kompliziert werden, ist allgemein anerkannt. Die Anwendung der Gleichung des Massenwirkungsgesetzes ist unter solchen Verhältnissen beschränkt durch die ungleiche Verteilung des Solvats zwischen den verschiedenen Phasen infolge verschiedener Löslichkeit, durch den verschiedenen Dissoziationsgrad der Elektrolyte in verschiedenen Phasen, und vor allem durch die Vorgänge an der Phasengrenze. Infolge ungleicher Verteilung der Anionen und Kationen zwischen den Phasen müssen hier Grenzpotentiale auftreten. Ganz besonders aber ist mit der Möglichkeit von Konzentrationsänderungen durch Adsorption an der Phasengrenze zu rechnen. Neben der Ladung sind auch die Kräfte der Oberflächenspannung an der Phasengrenze zu beachten, die außer von der Ladung auch von der Zusammensetzung der Phasengrenze bestimmt werden. Zweifellos lassen sich für viele in heterogenen Systemen ablaufende Prozesse Gleichungen finden, die formal dem Massenwirkungsgesetz entsprechen und hinreichende Konstanz der Reaktionskonstanten aufweisen. Durch solche rein formale Übereinstimmung ist jedoch der Beweis nicht erbracht, daß der Ablauf der Reaktion tatsächlich einem in homogenem System vorkommenden analog ist. Die Ordnung der Reaktion, d. h. die Zahl der an ihr teilnehmenden Molekülgattungen, läßt sich aus solch rein formaler Übereinstimmung nicht mit Sicherheit erschließen. Oft genügen Änderungen der äußeren Bedingungen, um die „Konstanz“ einer so ermittelten Reaktionskonstanten wieder auf-

zuheben [A. Hahn¹⁾]. Solche rein empirisch aufgestellte Gleichungen sind nur der Beweis, daß nahezu jede Gleichung mit einer genügenden Anzahl von Konstanten mit der beobachteten Tatsache in Einklang gebracht werden kann, falls die Konstanten möglichst günstig gewählt werden [E. J. Warburg²⁾]. Wenn das Massenwirkungsgesetz in seiner einfachen Form überhaupt in Anwendung gezogen werden will, muß die betrachtete Reaktion zum mindesten stetig verlaufen und umkehrbar sein. Falls es sich um chemische Reaktionen handelt, soll außerdem der Temperaturkoeffizient zwischen 2 und 3 liegen. Sobald in irgend einem Bezirk der Reaktionsverlauf einer dieser Bedingungen nicht genügt, so muß daraus der Schluß gezogen werden, daß bei ihm Vorgänge eine Rolle spielen, die bei der üblichen Formulierung des Massenwirkungsgesetzes nicht berücksichtigt sind. Eine einzige sicher nachgewiesene Abweichung von dem Verlauf genügt zu diesem Schlusse, auch dann, wenn sich unter anderen Versuchsbedingungen über beliebig lange Strecken des Reaktionsverlaufs eine formale Übereinstimmung mit irgend einer Gleichung des Massenwirkungsgesetzes nachweisen läßt, wobei es ganz gleichgültig bleibt, welche Ordnung eine solche Gleichung besitzt. Es ist natürlich durchaus möglich, daß sich auch für solche Vorgänge, die in der genannten Art von der einfachen Formulierung des Massenwirkungsgesetzes abweichen, ein mathematischer Ausdruck des Reaktionsverlaufs finden läßt, und es ist durchaus zu erstreben, solche Formeln zu finden. Eine solche Formulierung, die für heterogene Systeme Geltung besäße, würde sich zwar in mancher Beziehung an das Massenwirkungsgesetz anzulehnen haben, würde sich aber eben dadurch grundsätzlich von dem für homogene Systeme geltenden Massenwirkungsgesetz unterscheiden, daß sie der Heterogenität der Lösung Rechnung trägt. Daß eine Formulierung, die die Phasengrenzkkräfte vernachlässigt, für heterogene Systeme keine allgemeine Geltung besitzen kann, dürfte wohl kaum zu bestreiten sein. Die Frage, ob für irgend ein bestimmtes heterogenes System und unter bestimmten Bedingungen einmal dieselben Gesetze maßgebend sein können wie für homogene Systeme, bedarf sehr sorgfältiger und kritischer Prüfung unter Berücksichtigung der genannten Gesichtspunkte.

Von verschiedenster Seite ist die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Eiweißkörper, Immunkörper und Fermente versucht worden. Die in Lösungen der genannten Körper beobachteten Erscheinungen hat man durch die Annahme ihrer Ampholytnatur zu erklären versucht. Analog den bei Aminosäuren tatsächlich vorkommenden Verhältnissen schrieb man ihnen die Eigenschaft zu, je

¹⁾ A. Hahn, Die Bedeutung des Massenwirkungsgesetzes für die Physiologie, S. 129. Habilitationsschrift, München 1921.

²⁾ E. J. Warburg, The biochem. Journ. 16, 284, 1922.

nach der Reaktion des Mediums entweder Wasserstoff- oder Hydroxylionen abzuspalten und dementsprechend sei es als Anionen, sei es als Kationen in der Lösung zugegen zu sein. Die Wanderungsrichtung der Körper in einem elektrischen Potentialgefälle und ihre Änderung mit der Reaktion des Mediums wurde als Beweis für ihre Ampholytnatur angesprochen. Für zahlreiche solcher Vorgänge sind Dissoziationskurven aufgestellt worden, die der Ausdruck der mathematischen Formulierung des Reaktionsverlaufs sein sollen. Daß weitgehende Ähnlichkeiten mit kristalloiden Elektrolyten bestehen, ist nach diesen Feststellungen unbestreitbar. Die Identität des Wesens beider Vorgänge ist damit jedoch nicht erwiesen. Vielfach lassen sich die Gleichungen nur unter bestimmten Hilfsannahmen aufstellen, die für jedes einzelne System wieder andersartig sind.

Die Versuche, die Vorgänge in heterogenen Systemen der genannten Art unter die Formeln des Massenwirkungsgesetzes zu zwingen, haben denn auch mehrfach Widerspruch gefunden. Der Annahme von *Michaelis*, das Hämoglobin verhalte sich entsprechend dieser Theorie wie ein Ampholyt, entsprachen die Ergebnisse von Versuchen nicht, die wir bei Anwendung der von uns eingeführten Titration mit Kohlensäure auf hämoglobinhaltige Lösungen erhielten¹⁾. Wir konnten zeigen, daß unter den Verhältnissen unserer Versuche die Kohlensäurebindungskurve der Lösung nicht stetig verläuft, wie es das Massenwirkungsgesetz fordert, sondern daß eine Unstetigkeit, ein Knick, bei einem wohl charakterisierten Reaktionspunkte auftritt. Ferner wiesen wir nach, daß eine glatte Reversibilität des Vorganges nur so lange gewahrt ist, als diese kritische Reaktion nicht überschritten ist. Nach Überschreiten der kritischen Reaktion läßt sich das vorher bestehende Gleichgewicht nicht mehr, oder jedenfalls nicht mehr prompt erreichen. Zwei der oben genannten Voraussetzungen für die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes auf den betrachteten Vorgang waren also nicht mehr erfüllt. Zur Erklärung zogen wir Erscheinungen an der Phasengrenze heran, ohne uns über deren Natur zunächst näher auszusprechen, da wir zuvor weitere Versuche für erforderlich halten. Teils aus theoretischen Gründen, teils wegen der für jede einzelne Reaktion erforderlichen besonderen Annahmen (Labilität bestimmter Ionen, mehrfach geladene Ionen und dergleichen) haben *A. Hahn*²⁾ und *A. Fodor*³⁾ gleichzeitig und unabhängig voneinander der Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Fermentreaktionen widersprochen und Berücksichtigung der kolloidalen Eigenschaften gefordert. Ganz neuerdings

¹⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. 90, 305, 1918.

²⁾ A. Hahn, a. a. O., S. 139.

³⁾ A. Fodor, Das Fermentproblem. Dresden und Leipzig 1922.

hat *Fodor*¹⁾ gezeigt, daß bei Zusatz gleicher Mengen eines und desselben Globulinsols zu Kochsalzlösungen steigender Konzentration bei bestimmten Kochsalzkonzentrationen unstetige Änderungen der Leitfähigkeit des Gemisches auftreten. In Übereinstimmung mit den von uns anläßlich unserer Beobachtungen über die Kohlensäurebindungskurve des Blutes ausgesprochenen Gedankengängen betrachtet *Fodor* die von ihm gemachte Beobachtung als eines der beweisendsten Argumente für die Adsorptionsaufladung der Proteinoberflächen mit Elektrolyten, denn bei einer rein chemischen Bindung dürfte eine Diskontinuität dieser Art nicht bestehen.

Die konkreten Tatsachen, die unseren Widerspruch gegen die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die genannten Vorgänge veranlaßten, wurden vermehrt durch die Feststellung, daß zugleich mit der Unstetigkeit der Kohlensäurebindungskurve auch eine Unstetigkeit der Viskositätskurve²⁾ auftritt. Unsere Arbeiten haben zu Bemerkungen von verschiedener Seite Veranlassung gegeben. Eine Reihe von Beobachtungen stützt unsere Angaben, daß bei Zufügung von Säure zu einer hämoglobin-haltigen Flüssigkeit bei bestimmter Wasserstoffzahl eine unstetige Mehrbindung von Säure eintritt. *C. B. Coulter*³⁾ setzte zu Suspensionen von Schafblutkörperchen in Zuckerlösungen steigende Mengen von Salzsäure und beobachtete die Ladung der Körperchen durch Kataphorese. Trägt er auf der Abszisse die Wasserstoffionenkonzentration, auf der Ordinate den erforderlichen Zusatz von Salzsäure auf, so findet er bei der Wasserstoffzahl, bei der die Wanderungsrichtung der Körperchen weder stärker kathodisch noch anodisch ist, eine scharfe Knickung der Kurve, indem plötzlich viel größere Säuremengen zur weiteren gleichmäßigen Steigerung der Azidität notwendig sind. Durch Titration mit Salzsäure hat also *Coulter*, anscheinend ohne unsere Versuche zu kennen, grundsätzlich dieselbe Erscheinung beobachtet wie wir bei Titration mit Kohlensäure. Daß *Coulter* den isoelektrischen Punkt bei einem anderen Werte fand als wir, liegt an der Vorbehandlung der zum Versuch verwendeten Blutzellen. Vermutlich gehören auch die Beobachtungen von *Hartridge* und *Peters*⁴⁾ hierher, die feststellten, daß sich im isoelektrischen Punkt die Oberflächenspannung zwischen Olivenöl und Wasser bei kleiner Änderung der Wasserstoffionenkonzentration sehr stark, um 35 %, ändert. *Parsons* und *Parsons*⁵⁾ haben unsere Versuche mit einer im wesentlichen übereinstimmenden Technik nachgeprüft und unsere Angaben über das Auftreten einer Unstetigkeit der Bindungskurve bestätigt. Kontrollen durch Messungen mit Konzentrationsketten ergaben die Richtigkeit unserer aus dem Kurvenverlauf berechneten Angabe, daß während der Unstetigkeit im ganzen Verlauf des Knicks die Reaktion konstant bleibt. Bei der Deutung dieser übereinstimmenden Befunde nehmen *Parsons* und *Parsons* an, gegenüber unserer Auffassung bestehe eine grundsätzliche Meinungsverschiedenheit. Unsere

¹⁾ *A. Fodor*, Kolloid-Zeitschr. 80, 313, 1922.

²⁾ *Kl. Meier*, diese Zeitschr. 128, 508, 1922.

³⁾ *C. B. Coulter*, Journ. of gen. Physiol. 3, 309, 1921; zitiert nach Zentralbl. f. d. ges. innere Med. 19, 236, 1921.

⁴⁾ *H. Hartridge* und *R. A. Peters*, Journ. of Physiol. 54, 41, 1920.

⁵⁾ *T. R. Parsons* und *W. Parsons*, ebendasselbst 56, 1, 1922.

Anschauung geben sie in der Weise wieder, daß wir während des Knicks eine Bindung von Kohlensäure an das Hämoglobinmolekül angenommen hätten, während sie selbst die Abgabe eines Atoms verfügbaren Natriums aus dem Hämoglobin vermuten. *Parsons* und *Parsons* haben unsere Meinung über diesen Punkt mißverstanden. Wir haben nie davon gesprochen, daß die Kohlensäure an das Hämoglobin gebunden werde, sondern den Vorgang stets rein beschreibend dahin wiedergegeben, daß von der Lösung pro Mol Hämoglobin 1 Mol Kohlensäure mehr gebunden werde. Diese unsere Auffassung haben wir an mehreren Stellen unserer Arbeiten näher erläutert. Außerhalb der isoelektrischen Zone haben wir Hämoglobin als starke Säure und starke Base angesprochen¹⁾, d. h. wir haben angenommen, es sei in der Lösung in dissoziierter Form vorhanden, also nicht an Bicarbonationen gebunden. In der nächsten Mitteilung²⁾ haben wir die in Betracht kommenden Vorgänge näher diskutiert und haben zur Erklärung die Adsorption von Anionen an der Oberfläche oder das Freiwerden adsorbierter Kationen aus der Oberfläche in Betracht gezogen. Die Annahme von *Michaelis*, daß sich während des Knicks der Bindungskurve vorwiegend undissoziiertes Hämoglobinbicarbonat bilde, also die Auffassung, die *Parsons* und *Parsons* als die unserige wiedergeben, haben wir ausdrücklich abgelehnt³⁾. Zum Beweis unserer Ablehnung haben wir gesagt, zur Neutralisation der Kohlensäure werden von dem Hämoglobin basische Valenzen zur Verfügung gestellt. Während des Knicks bilde sich Natriumbicarbonat. Das ist genau dieselbe Erklärung, die nun auch *Parsons* und *Parsons* für die Unstetigkeit geben. Die Meinung von *Parsons* und *Parsons*, daß zwischen ihrer und unserer Erklärung ein grundsätzlicher Unterschied bestehe, trifft nicht zu. Der Unterschied verschwindet sofort, sobald man mit dem Vorhandensein elektrolytischer Dissoziation rechnet. Nur insofern haben wir uns nicht so bestimmt ausgesprochen wie *Parsons* und *Parsons*, als wir von Anfang an nicht nur mit dem Vorhandensein undissoziierter Salze und dissoziierter Ionen, sondern auch mit der Anwesenheit elektrisch geladener Kolloidteilchen gerechnet haben, die nicht ohne weiteres unter den Begriff der Ionen einbegriffen werden dürfen, auch wenn ihre Ladung ihnen gewisse Ähnlichkeit mit einfach oder mehrfach geladenen Ionen verleiht. Das ist der Grund, weshalb wir uns, obgleich wir die später von *Parsons* und *Parsons* geäußerte Meinung ausdrücklich diskutiert haben, doch nicht ausschließlich auf diese festgelegt, sondern etwas allgemeiner ausgedrückt haben als *Parsons* und *Parsons*.

Von solchen Forschern, die an der Ampholyttheorie der Eiweißkörper festhalten, hat unsere Darstellung teilweise entschiedene Ablehnung erfahren. *E. J. Warburg*⁴⁾ trägt in seiner Dissertation alle Beobachtungen zusammen, die mit einer Darstellung der Kohlensäurebindungskurve des Blutes durch das Massenwirkungsgesetz übereinstimmen. Wie wir in der Einleitung ausgeführt haben, und wie auch *Warburg* gelegentlich anderen Forschern gegenüber betont, ist eine solche rein formale Übereinstimmung vieler Beobachtungen mit entsprechend formulierten Gleichungen des Massenwirkungsgesetzes nicht verwunderlich. Wie oben gesagt, können wir trotz zahlreicher übereinstimmender Beobachtungen die Allgemein-

¹⁾ *H. Straub* und *Kl. Meier*, diese Zeitschr. 90, XLI, 1918.

²⁾ *Dieselben*, ebendaselbst 98, 205, 1919.

³⁾ *Dieselben*, ebendaselbst 109, 47, 1920.

⁴⁾ *E. J. Warburg*, The biochem. Journ. 16, 153, 1922.

gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes nicht anerkennen, solange sich einzelne Beobachtungen solch allgemeiner Anwendung nicht fügen. Die seiner Auffassung widersprechenden Feststellungen beseitigt *Warburg* sehr kurz, indem er es bedauert, daß unsere Beobachtungen von mancher Seite Beachtung gefunden haben. Denn es sei doch handgreiflich, daß unsere Beobachtungen auf Mangel an Sorgfalt bei Handhabung der Technik beruhen. Bei unserem Vorgehen der Sättigung der Blutlösung mit Gasen bestimmter Zusammensetzung im Tonometer sei nicht zugewartet worden, bis Gleichgewicht zwischen Gas und Blut eingetreten sei. Dabei hat sich *Warburg* des von uns und den meisten anderen Untersuchern benutzten Tonometerverfahrens mit geschlossenem Tonometer überhaupt nicht bedient. Das von ihm benutzte Verfahren von *Hasselbalch* besteht darin, daß durch eine offene Flasche ein Gasstrom der gewünschten Zusammensetzung durchgeleitet wird. Es ist klar, daß bei diesem Vorgehen sehr lange Zeit verstreicht, ehe in der Flasche eine konstante Gasmischung eingetreten ist. *Warburgs* Vorwurf trifft also nur sein, nicht aber unser Verfahren. Unser Verfahren hat folgende weitere Vorzüge vor dem von *Warburg*: große Rotationsgeschwindigkeit, Verwendung sehr kleiner Blutmengen, Ausbreitung des Blutes auf sehr großer, sehr dünner Fläche, lauter Eigenschaften, die einen raschen Eintritt des Gleichgewichts begünstigen. Selbstverständlich hatten wir uns gleich zu Beginn unserer Versuche überzeugt, daß eine Rotation von 10 Minuten genügt, um bei unserem Verfahren Gleichgewicht zwischen Blut und Gasraum zu erzielen. Wir haben solche Versuche nochmals mit demselben Ergebnis wiederholt. *Warburg* gibt unsere Auffassung in zahlreichen Einzelheiten unrichtig wieder. Wir haben gezeigt, daß bei Überschreitung einer wohl definierten Wasserstoffzahl eine Unstetigkeit der Kohlensäurebindungskurve auftritt, im Gesamtblute bei $p_H = 6,52^1)$, bei einer Temperatur von 37° , und daß nach Überschreitung dieser Wasserstoffzahl die Verhältnisse nicht glatt reversibel sind. Diese Beobachtung hatten wir als Beweis gegen die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes angeführt. Die Angabe *Warburgs*, wir selbst hätten bemerkt, daß bei diesem Versuche kein Gleichgewicht zwischen Gas und Blut eingetreten sei, entstellt den Sinn unserer Angaben gröblich. Zum Beweis, daß die Verhältnisse reversibel seien, führt *Warburg* einen einzigen Versuch an, der aber bei 21° angestellt ist. Bei welcher Wasserstoffzahl die Unstetigkeit im Gesamtblut auftritt, wenn die Temperatur niedriger ist als in unseren Versuchen, ist nicht bekannt. Sicher tritt sie erst bei viel höheren Kohlensäurespannungen auf als bei 37° . Blutkörperchensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung haben bei 37° den Knick bei $p_H = 6,67$, bei 20° aber erst bei $p_H = 6,35^2)$. Wir hatten behauptet, die Reaktion sei nicht prompt reversibel, sobald eine bestimmte kritische Wasserstoffzahl überschritten sei. Den Beweis, daß in seinem Versuche diese kritische Wasserstoffzahl überschritten ist, hat *Warburg* zu erbringen nicht versucht. Wenn die Temperatur auf die Lage der Unstetigkeit im Gesamtblute denselben Einfluß hat wie bei Suspensionen in Kochsalzlösungen, ist die Unstetigkeit in diesem Versuche tatsächlich nicht überschritten. Wir stellen also fest, daß *Warburg* sich nicht die Mühe genommen hat, unsere Angaben richtig wiederzugeben oder auch nur in einem einzigen Versuche nachzuprüfen. Dieser Mangel an Beweisen läßt sich durch temperamentvolle Ablehnung unserer Versuche nicht aus der Welt schaffen.

¹⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. 89, 156, 1918.

²⁾ Kl. Meier, ebendasselbst 128, 508, 1922.

Viel bedeutungsvoller ist der Einspruch, den *Michaelis* und *Airila*¹⁾ gegen unsere Darstellung erhoben haben. Ohne auf frühere Erörterungen²⁾³⁾ zurückzukommen, glauben die genannten Autoren unsere Angaben durch Kataphoreseversuche widerlegen zu können. Hämolyzierter Blutkörperchenbrei wurde bei diesen Versuchen in Pufferlösungen bekannter Wasserstoffionenkonzentration gebracht und die Wanderungsrichtung des Hämoglobins im elektrischen Potentialgefälle untersucht. Es ist anzunehmen, daß die in den Pufferlösungen enthaltenen Ionen auf den Vorgang der Entladung einen Einfluß ausüben, der bei verschiedenen Ionen wechselt. Verwendet wurden Phosphat-, Borat- und Acetatpuffer. Daß *Michaelis* und *Airila* die Wirkung der verschiedenen Ionen ihrer Pufferlösungen auf den beobachteten Vorgang bei ihren Überlegungen nicht berücksichtigt haben, hat quantitative, aber wohl kaum grundsätzliche Bedeutung. Bei stark basischen Reaktionen verläuft die durch Kataphorese bestimmte Kurve der Wanderungsgeschwindigkeit anscheinend nicht so stetig wie die Theorie das verlangen würde. Dennoch würden wir die Versuche von *Michaelis* und *Airila* als beweisend ansehen, wenn sie mit den unseren vergleichbar wären. Diese Autoren halten die Kataphorese für die direkteste und beweisendste Methode zur Beantwortung der gestellten Frage. Das ist sie nur dann, wenn ausgeschlossen werden kann, daß der Durchgang konstanten Stromes durch heterogene Lösungen die Phasengrenzen verändert. Da die Wirkung des konstanten Stromes auf lebende Zellen als eine Einwirkung auf die Phasengrenzen aufgefaßt wird, ist diese Annahme von vornherein nicht zulässig. Eine von uns⁴⁾ gelegentlich mitgeteilte Beobachtung mußte zu weiterer Vorsicht mahnen. Bei dem Versuche, unsere Feststellungen durch Leitfähigkeitsmessungen zu klären, stellten wir fest, daß eine Suspension von roten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung vor Ausführung einer Leitfähigkeitsmessung wesentlich weniger Kohlensäure aus derselben Gasatmosphäre aufnahm, als nachdem zur Leitfähigkeitsmessung faradischer Strom durch die Suspension durchgegangen war. Diese Mehraufnahme konnte nur durch eine wesentliche Änderung der Eigenschaften der roten Blutkörperchen erklärt werden. Auch fand sich der Knick der Bindungskurve nicht mehr an dem erwarteten Platze. Die Unstetigkeit, deren Prüfung durch Leitfähigkeitsmessungen geplant war, war also unter der Einwirkung des faradischen Stromes verändert worden. Falls sich an hämolysiertem Blute und unter der Einwirkung des konstanten Stromes dieselbe Veränderung der Bindungskurve findet wie in den eben

1) *L. Michaelis* und *Y. Airila*, diese Zeitschr. 118, 144, 1921.

2) *Derselbe*, ebendasselbst 103, 53, 1920.

3) *H. Straub* und *Kl. Meier*, ebendasselbst 109, 47, 1920.

4) *Dieselben*, ebendasselbst 98, 222, 1919.

erwähnten Versuchen, muß die Stetigkeit der Kurven, die *Michaelis* und *Airila* in ihren Kataphoreseversuchen feststellten, durch die Einwirkung des elektrischen Stromes auf die Phasengrenze erklärt werden. Dann ist der Kataphoreseversuch nicht geeignet, die Vorgänge an der unveränderten Phasengrenze aufzuklären. Diese Frage experimentell zu klären, war die Aufgabe der im folgenden mitzuteilenden Versuche.

1. Die Wirkung des faradischen Stromes auf Blutkörperchensuspensionen.

Der in unserer früheren Mitteilung nur kurz erwähnte Versuch ist in der Tabelle im Anhang zahlenmäßig wiedergegeben (Nr. 1). Mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschene menschliche Erythrocyten wurden im Tonometer bei 37° mit Gas bekannter Kohlensäurespannung (17,8 mm) in Gleichgewicht gebracht, eine Probe zur Gasanalyse entnommen und dann eine Leitfähigkeitsmessung vorgenommen, wobei das Blut im Thermostaten von 37° im Tonometer verblieb, in das die üblichen Elektroden zur Leitfähigkeitsmessung von 1 qcm im Abstand von 1 cm eingefügt waren. Nach Durchgang des zur Leitfähigkeitsmessung benötigten faradischen Stromes band das Blut

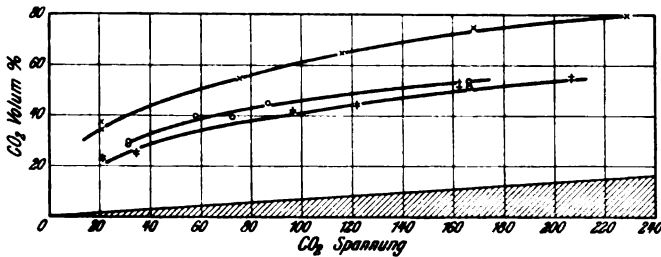


Abb. 1.

Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung, faradisiert. Abszisse: Kohlensäurepartialdruck in Millimetern Hg. Ordinate: Kohlensäurekapazität in Volumprozenten. Schraffiertes Dreieck am Unterrande: physikalisch absorbierte Kohlensäure.

bei Kohlensäurespannung 20,5 mm 36 Vol.-Proz. Kohlensäure, während es zuvor nur 24 gebunden hatte. Die nunmehr erhaltene Kohlensäurebindungskurve des faradisierten Blutes zeigt keine Unstetigkeit mehr, Abb. 1, ausgezogene Kurve, liegende Kreuze. Sie steigt viel steiler an als die Bindungskurve einer in derselben Weise vorbehandelten, aber nicht faradisierten Blutkörperchensuspension. All das, was wir als charakteristisch für den Verlauf der Bindungskurve geschildert hatten, ist also verschwunden, nämlich die Unstetigkeit und der nur unmerkbare Anstieg der Bindungskurve in dem Stück unmittelbar vor Auftreten der Unstetigkeit. In der hier mitgeteilten Kurve wirken die roten Blutkörperchen nicht mehr zunächst wie eine starke Säure, um dann plötzlich ihre Ladung zu verlieren, sondern jetzt nach der Faradi-

sation verläuft der Vorgang stetig. Während der ganzen wiedergegebenen Strecke der Bindungskurve wird der zutitrierten Kohlensäure eine stetig zunehmende Menge von Alkali zur Verfügung gestellt. Unsere Bindungskurve gleicht jetzt also vollkommen der, die wir erhalten hatten, wenn wir zu Serum Phosphat als Puffer zugesetzt hatten¹⁾. Das ist der Verlauf der Bindungskurve, der nach der Ampholyttheorie von *Michaelis* zu erwarten war. Aber dieser Verlauf tritt eben nur unter der Einwirkung der Faradisation auf. Vor der Faradisation war der Bindungsverlauf ein durchaus anderer, mit der Theorie von *Michaelis* nicht in Einklang zu bringender. Das kann nur so verstanden werden, daß durch die Faradisation die vorher wirksamen wichtigen Eigenschaften der Phasengrenze von Grund auf geändert und gestört wurden. Die Beobachtung ist keine zufällige. Aus unseren alten Versuchsprotokollen fügen wir einen weiteren Versuch (Nr. 2) an, der in genau derselben Weise angestellt, genau dasselbe Ergebnis lieferte. Die ganze Kurve liegt etwas tiefer als die des Versuchs Nr. 1, aber sonst verlaufen beide Kurven absolut parallel. Durch zwei neue Versuche (Nr. 3 und 4) haben wir diese Beobachtungen ergänzt (Abb. 1, Ringe, bzw. stehende Kreuze). Bei diesen beiden Versuchen wurden Menschenblutkörperchen mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, in dieser suspendiert und in einer Porzellanschale der faradische Strom des üblichen klinischen Faradisationsapparats durchgeschickt. Auch diese beiden Versuche führen zu demselben Ergebnis. Auch diesmal steigen die Kurven stetig an und verlaufen annähernd parallel den Kurven der beiden ersten Versuche. Ein Knick tritt in allen diesen Versuchen nicht auf.

2. Die Wirkung des faradischen Stromes auf Hämoglobin.

Die Frage, ob diese Wirkung des faradischen Stromes nur an Zellgrenzen auftritt, oder für kolloidale Oberflächen schlechthin Geltung besitzt, konnte entschieden werden, indem Blut mit Saponin hämoly-

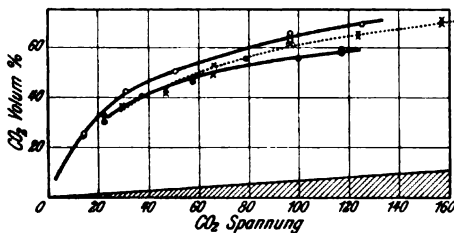


Abb. 2. Kohlensäurebindungskurven von hämolyisiertem Blute, faradisiert. Erklärung wie Abb. 1.

lysiert und der Wirkung des faradischen Stromes unterworfen wurde, ehe die Kohlensäurebindungskurve bestimmt wurde. Die Faradisation geschah in der oben beschriebenen Weise in einer Porzellanschale. Während das hämolyalisierte, nicht faradisierte Blut eine charakteristische

¹⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. 89, 156, 1918.

Unstetigkeit bei der Wasserstoffzahl $p_H = 7,00$ aufweist¹⁾, ist nach Faradisation des Blutes diese Unstetigkeit verschwunden (Abb. 2, Versuche Nr. 5, 6 und 7). Wieder verläuft die Bindungskurve jetzt stetig, wie das nach der Theorie von *Michaelis* zu erwarten wäre. Wieder aber ist dieser stetige Verlauf erst aufgetreten, nachdem die Hämoglobinteilchen durch den faradischen Strom so beeinflußt wurden, daß eine wesentliche Eigenschaft ihrer Oberfläche sich änderte. Die Erklärung von *Michaelis* paßt für das faradisierte, nicht aber für das ursprüngliche Blut.

3. Die Wirkung des konstanten Stromes auf Blutkörperchensuspensionen.

Bei den Kataphoreseversuchen von *Michaelis* war nun aber nicht die Einwirkung faradischen, sondern konstanten Stromes in Betracht zu ziehen. Besteht doch die Versuchsanordnung darin, daß durch die Lösung oder Suspension konstanter Strom, meist aus dem Stadtnetze, durchgeschickt und die Wanderungsrichtung der kolloiden Teilchen im elektrischen Potentialgefälle beobachtet wird. In zwei Versuchen (Nr. 8 und 9, Abb. 3) haben wir Suspensionen menschlicher roter Blut-

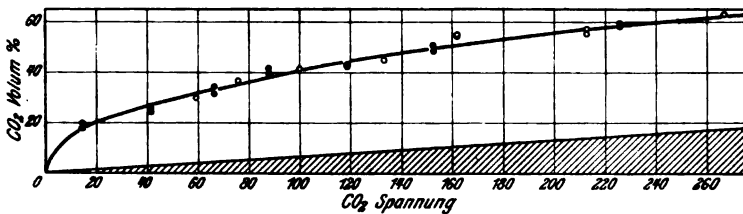


Abb. 3.

Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in physiologischer Kochsalzlösung nach Durchströmung mit konstantem Strom. Erklärung wie Abb. 1.

körperchen in physiologischer Kochsalzlösung in ein V-förmiges Rohr gebracht, beide Enden des Rohres durch in Kochsalzlösung getränkte Bänder mit Bechergläsern verbunden, die ebenfalls physiologische Kochsalzlösung enthielten und wieder durch in Kochsalzlösung getränkte Bänder mit Bechergläsern verbunden waren, in deren Zinksulfatlösung Zinkelektroden tauchten. Der Flüssigkeitsspiegel wurde in allen Gefäßen auf dieselbe Höhe eingestellt. Außerdem war noch ein Lämpenwiderstand vorgeschaltet. Durch diese Kette ließen wir $1\frac{1}{2}$ bzw. $2\frac{1}{4}$ Stunden lang den Stadtstrom von 220 Volt Spannung gehen. Die Widerstände waren durch die Art unserer Elektroden sehr hohe, so daß die durchgehende Stromstärke recht gering zu veranschlagen ist. Die beiden Versuche ergeben ein übereinstimmendes Ergebnis. Statt bei

¹⁾ H. Straub und Kl. Meier, diese Zeitschr. 90, 305, 1918.

der charakteristischen Wasserstoffzahl von $p_H = 6,67$ eine Unstetigkeit aufzuweisen, wie das ohne Durchgang des konstanten Stromes der Fall wäre¹⁾, verlaufen die Kurven stetig und steigen über die ganze beobachtete Strecke gleichmäßig an, indem eine ständige Mehraufnahme von Kohlensäure über die physikalisch absorbierte Menge hinaus stattfindet. Wieder entspricht der Kurvenverlauf der Theorie von *Michaelis*, wieder ist aber diese Übereinstimmung mit der Theorie erst erreicht, nachdem die Oberfläche der Blutkörperchen wesentlich durch die Wirkung des durchgeschickten konstanten Stromes verändert ist.

4. Die Wirkung des konstanten Stromes auf Hämoglobin.

Um schließlich Versuchsbedingungen zu haben, die in allen wesentlichen Punkten mit denen von *Michaelis* und *Airila* vollkommen übereinstimmen, wurde mit Saponin hämolysiertes Blut in der oben geschilderten Weise im V-Rohr ebenfalls mit konstantem Stadtstrom durchströmt (Abb. 4, Versuch Nr. 10, 11 und 12). In dem Versuche

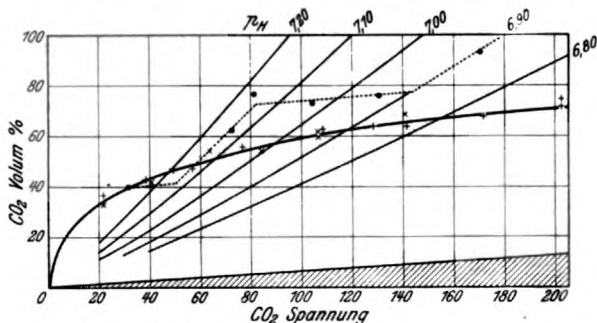


Abb. 4.

Kohlensäurebindungskurven von hämolysiertem Blut nach Durchströmung mit konstantem Strom. Erklärung wie Abb. 1.

Nr. 10, bei dem nur $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei hohen Widerständen durchströmt wurde, ist der Verlauf der Bindungskurve noch nicht grundsätzlich verschieden von dem ohne Einwirkung des Stromes beobachteten. Eine Unstetigkeit ist noch vorhanden, aber statt bei $p_H = 7,00$ findet sie sich jetzt bei $p_H = 7,15$. Die Entladung des Hämoglobins ist also durch den Durchgang des konstanten Stromes bedeutend begünstigt. In den Versuchen Nr. 11 und 12, bei denen der Strom 1 bzw. 3 Stunden durch das Blut durchging, ist dann die Wirkung wieder vollendet, eine Unstetigkeit der Kohlensäurebindungskurve tritt nicht mehr auf, die Kurve steigt stetig und anhaltend bis an die beobachtete Grenze an. Bei Nachahmung der Versuchsbedingungen, die in den Versuchen

¹⁾ H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 98, 205, 1919.

von *Michaelis* und *Airila* vorlagen, erhalten wir also Ergebnisse, die mit völlig abweichender Methodik die Angaben der genannten Forscher sachlich vollkommen bestätigen. Eine Unstetigkeit der Bindungskurve tritt nicht auf, diese verläuft so, wie sie nach der Ampholytttheorie von *Michaelis* verlaufen müßte. Aber dieser Verlauf der Bindungskurve ist ein Kunstprodukt, hervorgerufen durch die Wirkung des konstanten Stromes auf die Phasengrenze. Die Übereinstimmung der so erhaltenen Kurve mit der Theorie von *Michaelis* zeigt zwingend, daß diese Theorie in keinerlei Form auf die grundsätzlich vollkommen andersartig verlaufende Bindungskurve angewendet werden kann, die wir vor Einwirkung des konstanten Stromes erhalten haben. Wir halten durch das Ergebnis dieser Versuche die Meinungsverschiedenheit zwischen *Michaelis* und uns für völlig geklärt. Die Anschauung von *Michaelis* kann nur in Betracht gezogen werden, wenn künstlich die von uns analysierte Eigenschaft der Phasengrenze aufgehoben ist. Der ursprünglich erhaltene unstetige Kurvenverlauf beweist, daß für solche Lösungen die Ampholytttheorie aufgegeben werden muß.

Schlußbetrachtungen.

Nach diesen Feststellungen bleibt noch die Frage zu erörtern, welche Veränderungen an der Phasengrenze unter der Wirkung des konstanten und faradischen Stromes vor sich gehen. Bei Durchgang des Stromes durch Gewebe spricht man von Polarisation. Man wird geneigt sein, die Möglichkeit solch polarisierender Wirkung nur dann anzunehmen, wenn das Gewebe in seiner räumlichen Anordnung gegenüber dem Stromgefälle festgelegt ist. Unsere Beobachtungen zeigen, daß diese Voraussetzung nicht unbedingt erfüllt sein muß. Auch an suspendierten Teilchen und Kolloidpartikelchen können ähnliche Wirkungen auftreten. Der Versuch Nr. 10 scheint darauf hinzuweisen, daß das Wesen dieser Wirkung in einer Begünstigung der Entladung besteht. Folgerichtig würde man dann annehmen müssen, daß die stetig ansteigenden Kurven, die in allen übrigen Versuchen bei länger dauernder Einwirkung des Stromes erhalten wurden, dann auftreten, wenn die Entladung der Phasengrenze vollendet ist. Damit wäre auch erklärt, weshalb dann die Eigenschaften der Phasengrenze nicht mehr in Erscheinung treten. Der stetige Kurvenverlauf wäre also dann nur in dem Falle möglich, wo die Heterogenität der Lösung durch Aufhebung der Ladung der Phasengrenze beseitigt wäre. Erst nach ihrer Beseitigung ließen sich auf die Kolloidteilchen die Vorstellungen der elektrolytischen Dissoziation anwenden. Die Unstetigkeit der Bindungskurve, die vor Durchgang des elektrischen Stromes erhalten wird, wäre dann durch Ladungsänderungen an der Phasengrenze eindeutig erklärt.

Um diese Theorie zu prüfen, haben wir die Bindungskurve von Blutkörperchensuspensionen bestimmt, deren Ladung auf andere Weise aufgehoben war. Wir wissen, daß durch Auswaschen roter Blutkörperchen in isotonischen Zuckerlösungen deren Oberfläche stark verändert und ihre elektrische Ladung aufgehoben werden kann¹⁾. War unsere Anschauung richtig, daß der stetige Verlauf der Kohlensäurebindungskurven auf einer Entladung der roten Blutkörperchen beruht, so mußten wir denselben Verlauf der Bindungskurve ohne Einwirkung des elektrischen Stromes erhalten, wenn wir die Blutkörperchen statt in Kochsalzlösung in isotonischer Rohrzuckerlösung suspendierten. Das ist in der Tat der Fall (Versuch Nr. 13, 14 und 15, Abb. 5). Die drei Ver-

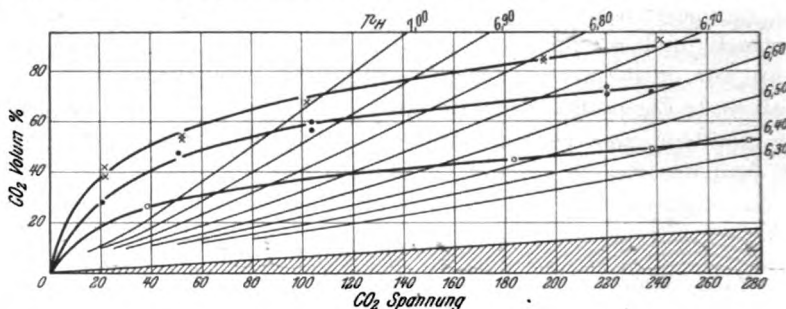


Abb. 5.

Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in isotonischen Rohrzuckerlösungen. Erklärung wie Abb. 1.

suche unterscheiden sich untereinander nur dadurch, daß der Rohrzuckerlösung in zwei Versuchen kleine Mengen von Natriumbicarbonat zugefügt wurden, um die Höhenlage der Bindungskurve zu variieren und dadurch um so eindeutigere Ergebnisse zu erhalten. Diese stimmen bei allen drei Versuchen vollkommen überein. Alle drei verlaufen stetig über den ganzen beobachteten Bezirk, alle nehmen im ganzen Bezirk dauernd mehr Kohlensäure auf, als der physikalischen Absorption entspricht. Der Kurvenverlauf entspricht im Grundsatz vollkommen dem, der in Abb. 1 und 3 wiedergegeben ist und nach Einwirkung des faradischen bzw. konstanten Stromes auf Blutkörperchensuspensionen in Kochsalzlösung erhalten wurde. Die tiefste Rohrzuckerkurve entspricht auch im einzelnen sehr nahezu der Kurve der Abb. 3, die mittlere Rohrzuckerkurve sehr nahezu der höchsten der Abb. 1. Durch diese Versuchsergebnisse wird unsere Annahme also vollkommen bestätigt. Der stetige Verlauf tritt dann auf, wenn durch irgend eine Einwirkung die Ladung der Phasengrenze aufgehoben ist. Solange an der Phasengrenze eine Ladung vorhanden ist, verläuft die Bindungskurve anders.

¹⁾ W. Radsma, diese Zeitschr. 89, 211, 1918.

Für diesen unstetigen Verlauf der Bindungskurve kann deshalb die Ampholyttheorie der Eiweißkörper nicht gelten.

Noch eine für die Technik bedeutsame Folgerung muß aus unseren Versuchen gezogen werden. Wir fanden, daß der Durchgang konstanten oder faradischen Stromes durch heterogene Lösungen das in solchen Systemen herrschende Gleichgewicht in wesentlicher Weise stört. Die Ladung der Phasengrenze, jedenfalls die negative Ladung der hier betrachteten Systeme, wird vermindert, bei genügend langem Stromdurchgang aufgehoben. Diese Feststellung verbietet die Verwendung von Leitfähigkeitsmessungen und Kataphoreseversuchen an heterogenen Systemen. Die Annahme von *Michaelis* und *Airila*, daß der Kataphoreseversuch das einzige eindeutige Verfahren sei, um die Frage der Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes auf Hämoglobinlösungen zu prüfen, ist unzutreffend. Im Gegenteil kommt man wegen der Wirkung des konstanten Stromes auf die Phasengrenze zu ganz falschen Ergebnissen. Nicht der Kataphoreseversuch, sondern die von uns eingeführte Titration, sei es mit Kohlensäure oder einer anderen Säure, ist das einzige bisher bekannte Verfahren, das die Entscheidung dieser wichtigen Frage geben kann.

Zusammenfassung.

Durch Durchleiten konstanten oder faradischen Stromes durch Blutkörperchensuspensionen in Kochsalzlösung oder durch hämolyisiertes Blut wird der Verlauf der Kohlensäurebindungskurve grundsätzlich verändert. Die Kurve verläuft nun stetig und stark gepuffert, genau als wären reichliche Mengen eines anorganischen Puffers in der Lösung enthalten.

Ein solcher Kurvenverlauf läßt sich in Einklang bringen mit der Theorie von *Michaelis*, daß das Hämoglobin durch seine Ampholytnatur Pufferwirkung entfalte. Er entspricht den Befunden, die *Michaelis* und *Airila* bei Kataphoreseversuchen erhoben haben.

Da die Kohlensäurebindungskurven derselben Lösungen vor Durchgang elektrischen Stromes einen grundsätzlich anderen Verlauf nehmen, kann für diesen Verlauf die Theorie von *Michaelis* keine Geltung besitzen. Vielmehr sind diese Befunde ein zwingender Beweis für unsere von Anbeginn vertretene Auffassung, daß das Massenwirkungsgesetz auf heterogene Lösungen nicht allgemein anwendbar ist.

Die Übereinstimmung der nach Vorbehandlung mit elektrischem Strom erhaltenen Bindungskurven mit solchen von Blutkörperchensuspensionen in Rohrzuckerlösung zeigt, daß eine stetige Bindungskurve mit stark gepuffertem Verlauf auftritt, sobald die Ladung der Phasengrenze beseitigt wird.

Kataphorese und Leitfähigkeitsmessung lassen sich, wegen der Wirkung des Stromes auf die Eigenschaften der Phasengrenze, bei Untersuchungen an heterogenen Systemen nicht anwenden.

Versuchsprotokolle.

1. Blutkörperchensuspension in $\left\{ \begin{array}{l} \text{NaCl } 0,14 \\ \text{NaHCO}_3 \text{ } 0,015 \end{array} \right\}$ molar; faradisiert zur Leitfähigkeitsmessung. Abb. 1, liegende Kreuze.

		vor	nach Faradisation			
CO ₂ -Spannung	17,8	20,5	75,1	115,4	167,3	228,5
CO ₂ -Kapazität	24,5	37,3	54,8	64,2	74,9	79,3
	22,9	34,2				
Ω		637	675	744	753	

2. Blutkörperchensuspension in 0,9 % NaCl; faradisiert zur Leitfähigkeitsmessung.

CO ₂ -Spannung	25,5	58,6	100,0	124,3	143,0	230,0
CO ₂ -Kapazität	22,2	38,6	42,1	49,5	53,8	68,0
Ω	527	541	549	561	570	587

3. Blutkörperchensuspension in 0,9 % NaCl; $\frac{1}{2}$ Stunde faradisiert. Abb. 1, Ringe.

CO ₂ -Spannung		31,2	58,0	72,5	86,4	166,4
CO ₂ -Kapazität		28,8	39,8	38,9	44,8	53,7
		29,4	39,7			51,1

4. Blutkörperchensuspension in 0,9 % NaCl; 2 Stunden faradisiert. Abb. 1, stehende Kreuze.

CO ₂ -Spannung	21,1	34,8	96,7	121,9	162,1	206,9
CO ₂ -Kapazität	22,4	25,6	41,7	44,4	53,4	54,5
	23,3	24,5	41,2	43,6	51,2	55,5

5. Saponinhämolyse; faradisiert. Abb. 2, liegende Kreuze.

CO ₂ -Spannung	29,4	46,9	65,6	95,9	123,2	156,6
CO ₂ -Kapazität	36,4	42,5	52,7	62,6	65,2	71,3
		41,2	48,9	61,5	64,1	69,3

6. Saponinhämolyse; 1 Stunde faradisiert. Abb. 2, Ringe.

CO ₂ -Spannung		14,6	30,9	50,5	96,4	125,1
CO ₂ -Kapazität		25,3	42,4	49,9	65,5	69,0
		24,7	42,7	50,4	62,7	

7. Saponinhämolyse; $2\frac{1}{2}$ Stunden faradisiert. Abb. 2, Punkte.

CO ₂ -Spannung	22,3	37,1	57,3	78,8	100,0	117,0
CO ₂ -Kapazität	30,8	40,6	46,6	55,5	55,3	59,1
	32,8		47,9		55,6	57,7

8. Blutkörperchensuspension in 0,9 % NaCl; durchströmt $1\frac{1}{2}$ Stunden mit konstantem Strom. Abb. 3, Ringe.

CO ₂ -Spannung	59,2	75,7	99,9	132,8	161,5	212,3	266,7
CO ₂ -Kapazität	29,5	36,8	41,7	44,9	54,4	55,3	62,8
	29,9		41,4	44,2	55,1	57,2	63,2

9. Blutkörperchensuspension in 0,9 % NaCl; durchströmt $2\frac{1}{4}$ Stunden mit konstantem Strom. Abb. 3, Punkte.

CO ₂ -Spannung .	14,3	41,6	66,2	87,4	118,8	152,1	225,1
CO ₂ -Kapazität .	19,8	26,5	34,2	41,9	43,3	50,7	59,6
	17,6	25,5	31,9	39,2	42,2	48,6	57,6

10. Saponinhämolyse; durchströmt $\frac{1}{2}$ Stunde mit konstantem Strom. Abb. 4, Punkte.

CO ₂ -Spannung	31,6	72,5	81,5	104,2	130,2	170,4
CO ₂ -Kapazität	39,8	62,0	76,4	72,7	75,7	92,6
	39,7					

pH.	7,34	7,14	7,17	7,03	6,94	6,90
		Knick.				Zweiter Knick.

11. Saponinhämolyse; durchströmt 1 Stunde mit konstantem Strom. Abb. 4, liegende Kreuze.

CO ₂ -Spannung .	21,9	40,5	48,3	63,4	84,1	106,5	140,4
CO ₂ -Kapazität .	32,4	41,9	46,3	54,0	53,9	61,5	68,2
						59,2	

12. Saponinhämolyse; durchströmt 3 Stunden mit konstantem Strom. Abb. 4, stehende Kreuze.

CO ₂ -Spannung	21,9	38,7	56,3	76,1	108,3	128,0	141,4	171,5	202,5
CO ₂ -Kapazität	33,7	42,6	47,0	55,5	62,6	63,4	63,5	67,7	74,3
	36,1								71,2

13. Blutkörperchensuspension in Rohrzuckerlösung, 0,3 molar. Abb. 5, Ringe.

CO ₂ -Spannung . . .	38,2	183,4	238,1	276,0
CO ₂ -Kapazität . . .	26,5	44,9	49,1	52,8

14. Blutkörperchensuspension in $\left\{ \begin{array}{l} \text{Rohrzucker } 0,287 \\ \text{Na bicarbonic. } 0,0043 \end{array} \right\}$ molar. Abb. 5, Punkte.

CO ₂ -Spannung	20,3	50,5	103,8	220,3	238,0
CO ₂ -Kapazität	28,0	47,2	59,8	70,7	71,8
			56,7	73,7	

15. Blutkörperchensuspension in $\left\{ \begin{array}{l} \text{Rohrzucker } 0,238 \\ \text{Na bicarbonic. } 0,03 \end{array} \right\}$ molar. Abb. 5, liegende Kreuze.

CO ₂ -Spannung	21,7	52,1	101,8	195,3	241,2
CO ₂ -Kapazität	42,0	54,1	67,3	84,4	92,1
	38,3	53,4		84,9	

Über das Verhalten von Brenztraubensäure und Acetaldehyd gegenüber mit Sauerstoff gelütteter Hefe.

Von

Fritz Lieben.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 10. November 1922.)

In einer Reihe von in letzter Zeit im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen haben Fürth und Lieben¹⁾ gezeigt, daß milchsaures Alkalisalz bei Durchleiten von O₂ durch eine geschüttelte Hefesuspension bis auf wenige Prozente daraus verschwindet, und haben den Betrag der Umwandlungen festgestellt; ferner hat in einer demnächst erscheinenden Arbeit H. Lundin die gleiche Versuchsanordnung auf einige Fettsäuren, Zuckerarten und Alkohol angewendet; es zeigte sich im wesentlichen, daß Fettsäuren nicht angegriffen werden, während gewisse Zucker und Alkohol in wechselnden Mengen verschwinden. Schließlich habe ich²⁾ mit der beschriebenen Versuchsanordnung bei einigen Aminosäuren festgestellt, daß diese im Betrage von 60 bis 80 % unverändert bleiben, während der Rest (ohne nennenswerte CO₂-Entwicklung) von der Hefe konsumiert wird.

Ein Überblick über diese Versuchsergebnisse³⁾ deutet darauf hin, daß speziell die auf der Linie des Kohlehydratabbaus liegenden Stoffe (Traubenzucker, Fruchtzucker, Milchsäure, Alkohol) es sind, die bei O₂-Schüttelung durch Hefezellen zerstört werden, während Fettsäuren und die auf der Linie des Eiweißabbaus liegenden Aminosäuren nicht oder nur wenig angegriffen werden. Dies steht in Parallele zu der bekannten bevorzugten Stellung des KH-Stoffwechsels im Gesamtstoffwechsel, speziell soweit die Leistung von Arbeit in Betracht kommt.

Um diese Ansicht zu stützen, war es notwendig, weitere Stoffe, die im KH-Stoffwechsel eine Rolle spielen können, auf ihr Verhalten zu untersuchen. Unter diesen steht die Brenztraubensäure an erster Stelle, wie hauptsächlich aus den grundlegenden Arbeiten C. Neubergs und

¹⁾ O. v. Fürth und F. Lieben, diese Zeitschr. 128, 144; 132, 165.

²⁾ Ebendasselbst 132, 180.

³⁾ Vgl. F. Lieben, Österr. Chem.-Ztg. 25, Nr. 13, S. 87.

seiner Schüler hervorgeht, deren Ergebnisse zuerst in dieser Zeitschrift niedergelegt wurden.

Insbesondere das Verhalten von Brenztraubensäure gegenüber *Hefe* wurde von *Neuberg* und *Kárczag*¹⁾ untersucht und die Eigenschaften des Ferments *Carboxylase*, das bekanntlich die Spaltung in $\text{CH}_3\text{COH} + \text{CO}_2$ bewirkt, studiert. Ferner zeigte *Tschernorutzky*²⁾, daß lebenswarme, zerkleinerte Organe (Leber und Muskeln) Brenztraubensäure zu zerstören vermögen; *Boas*³⁾ ließ eine zur Hälfte neutralisierte Brenztraubensäurelösung als C-Quelle für Pilze und Hefen dienen, die fast alle zu guter Entwicklung kommen; *Fred, Peterson* und *Davenport*⁴⁾ sahen, daß Brenztraubensäure sowie Milchsäure und Äpfelsäure unter CO_2 -Entwicklung von pentosezerstörenden Bakterien angegriffen werden; *Nagayama*⁵⁾ ließ durch diese Pilze Brenztraubensäure in CO_2 und CH_3COH spalten.

Wie zu erwarten war, ergab sich aus den Versuchen, daß Brenztraubensäure als Na-Salz bei CO_2 -Schüttelung mit Hefezellen fast vollständig verschwindet und daß die C-Bilanz qualitativ und quantitativ ungefähr dieselbe ist wie bei der Milchsäure.

Methodik und Versuche.

Um die Brenztraubensäure zu bestimmen, bediente ich mich des folgenden einfachen Verfahrens. Die Lösung bzw. das Hefefiltrat wurde auf 10 % HCl gebracht und mit Zinkstaub etwa 2 Stunden am Babotrichter mit Rückflußkühler gekocht; dabei wird die Brenztraubensäure quantitativ zu Milchsäure reduziert und die letztere nach *Fürth* und *Charnass*⁶⁾ bestimmt.

2,4315 g reiner Brenztraubensäure (*Kahlbaum*) wurden in 200 ccm H_2O gelöst; 10 ccm mit Phenolphthalein titriert, verbrauchten 13,9 ccm n/10 NaOH (ber. 13,8 ccm), 20 ccm dieser Lösung wurden mit 5 g Zn-Staub und 400 ccm HCl 10 % am Rückflußkühler $2\frac{3}{4}$ Stunden gekocht, dann vom Zink filtriert, Cl-frei gewaschen und das Filtrat (mit einem Tropfen Dimethylaminoazobenzol als Indikator) mit 10 % NaOH neutralisiert, mit Na_2CO_3 schwach alkalisch gemacht, eingeengt, schließlich mit konzentrierter H_2SO_4 auf 0,5 % H_2SO_4 gebracht und nach *Fürth-Charnass* destilliert; 40 ccm (etwa 1,2 %) KHSO_5 wurden vorgelegt; verbraucht wurden 49,4 ccm n/10 Jod i. e. 0,247 g Brenztraubensäure, wenn man sich des empirischen $F = 0,005$ (wie bei der Milchsäurebestimmung) bedient; der richtige Faktor = 0,0044 liefert 0,2173 g statt 0,2432 g (i. e. 89,3 %).

Späterhin wurden stets aliquote Teile des Filtrats benutzt; so war z. B.:

1. das Volumen nach der Reduktion mit Zn: 430 ccm, davon wurden filtriert 250 ccm und wie oben weiter behandelt (natürlich ohne einzuengen), gef. 0,1223 g statt 0,1414 g (i. e. 86,5 %) uncorr., aus 170 ccm desselben Filtrats gef. 0,093 g korr. statt ber. 0,0962 (96,2 %), 0,082 g uncorr. (85 %).

1) *C. Neuberg* und *L. Kárczag*, diese Zeitschr. **36**, 68, 76.

2) Ebendasselbst **43**, 486.

3) Vgl. *C.* 1916, I, S. 431.

4) *C.* 1920, III, S. 670; 1921, I, S. 97.

5) *C.* 1921, II, S. 295.

6) *O. Fürth* und *D. Charnass*, diese Zeitschr. **26**, 199, 1910.

2. 15 ccm obiger Brenztraubensäurelösung in 400 ccm 10 proz. HCl mit 5 g Zinkstaub wie oben behandelt, ergaben ein Volumen von 410 ccm, davon filtriert 200 ccm, nach *Fürth-Charnass* gef. 0,0945 g korr., ber. 0,0889 i. e. 106 %, 0,0832 g unkorrr., ber. 0,0889 i. e. 93,6 %.

100 ccm desselben Filtrats liefern 0,0485 g korr. (109 %), 0,0427 g unkorrr. (95,9 %), ber. 0,0445 g.

3. 20 ccm obiger Lösung in 400 ccm 10 proz. HCl mit 5 g Zinkstaub behandelt usw.

Volumen 410 ccm, filtriert 180 ccm, gef. 0,1025 g korr. (96 %), 0,0902 g unkorrr. (84,3 %), ber. 0,1067 g.

Ich versuchte, auch die Brenztraubensäure durch oxydative Spaltung in CH_3COOH und CO_2 zu zerlegen und die erstere durch Titration zu bestimmen; als Oxydationsmittel bediente ich mich einer 2proz. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung, die Brenztraubensäure wurde aus Schwefelsäure von verschiedener Konzentration (0,5 bis 6 %), auch aus Phosphorsäurelösung (2 %) destilliert; die zuerst übergehende CO_2 wurde im $n/5$ $\text{Ba}(\text{OH})_2$ aufgefangen; da stets etwas mehr Säure als die auf CO_2 berechnete Menge übergang, wurden dann Kolbeninhalt und Destillat (letzteres nach Austreiben der CO_2 durch einmaliges Aufkochen mit verdünnter H_2SO_4) vereinigt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Es ging aber stets bedeutend mehr über, als der berechneten Menge Essigsäure entsprach; das Destillat reduzierte AgNO_3 (Ameisensäure?). Die Bichromatoxydation verläuft offenbar *nicht einheitlich* (neben $\text{CH}_3\text{COCOOH} + \text{O} = \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2$, vielleicht auch $\text{CH}_3\text{COCOOH} + 3 \text{O} = 2 \text{HCOOH} + \text{CO}_2$).

Bei den folgenden Versuchen mit Preßhefe wurde die Brenztraubensäure nach genauer Neutralisation durch NaOH zugesetzt. Ein Ausschütteln des Salzes aus den Hefefiltraten (wie es bei den milchsäuren Salzen geschah) erwies sich als entbehrlich, die Reduktion und Bestimmung wurde vielmehr im Filtrat direkt vorgenommen. Die Filtration erfolgte über Kieselgur, wobei das Filtrat fast frei von Eiweiß ist; die Spuren des letzteren machen sich bei der Destillation nach *Fürth-Charnass* durch einen erhöhten Verbrauch von KMnO_4 bemerkbar.

4. Zwei Glasstutzen wurden mit je 50 g Hefe, sowie je 40 ccm Brenztraubensäurelösung (= 0,48 g Säure), die durch je 54,6 ccm $n/10$ NaOH neutralisiert worden waren, versetzt und mit Leitungswasser aufgefüllt.

A. Volumen 570 ccm wurde gleich über Kieselgur filtriert.

Vom Filtrat wurden 176 ccm mit 59 ccm HCl (40 %) auf 10 % HCl gebracht, 200 ccm HCl (10 %) und 5 g Zn-Staub zugesetzt und 3 Stunden gekocht.

Vom Volumen 415 ccm wurden 300 ccm filtriert und wie oben weiter behandelt.

Destillat *Fürth-Charnass* ergibt Verbrauch von 22,5 ccm $n/10$ Jod, i. e. 0,1125 g Brenztraubensäure (korr.), dies bedeutet für 415 ccm (= 176 ccm ursprüngliches Filtrat) = 0,1556 g und für 570 ccm ursprüngliches Filtrat 0,504 g.

Andere Versuche für 50 g Hefe *allein* ergaben im Mittel 0,022 g, ergo entfallen auf den Zusatz 0,482 g in Übereinstimmung mit dem tatsächlichen Zusatz.

B. Volumen 600 ccm wurde erst bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen, dann über Kieselgur filtriert. Vom Filtrat wurden 200 ccm mit 66 ccm HCl (40 %) auf 10 % HCl gebracht, 60 ccm HCl (10 %) + 5 g Zn-Staub zugesetzt und 3 Stunden gekocht.

Vom Volumen 320 ccm wurden 310 ccm filtriert, verbraucht nach Fürth-Charnass 30,3 ccm n/10 J, i. e. 0,152 g Säure, für 320 ccm (= 200 ccm ursprüngliches Filtrat) 0,157 g, für 600 ccm ursprüngliches Filtrat 0,471 g minus die Menge in der Hefe allein 0,022 g, 0,449 g Säure, i. e. 93 %.

Bei Zimmertemperatur fand *keine Zerstörung* statt.

Bei den Schüttelversuchen bediente ich mich der beschriebenen (l. c.) Versuchsanordnung (2 Schüttelkolben und je 3 Vorlagen mit 500, 200 und 100 ccm n/5 Ba (OH)₂, die *Zuleitung des Sauerstoffs* erfolgt durch einen Dreiweghahn aus einer Bombe). Von den Barytvorlagen wurden Proben à 20 ccm in gewohnter Weise mit n/5 HCl und Phenolphthalein titriert.

5. Zwei Kolben mit je 50 g Hefe und Leitungswasser, Zusatz zu A.: 2,024 g Brenztraubensäure, durch NaOH neutralisiert, O₂-Schüttelung durch etwa 14 Stunden und Stehen über Nacht.

CO₂-Entwicklung aus A.: 2,14 g, aus B.: 0,38 g (auffallend niedrig!), auf Konto der Brenztraubensäure entfällt 1,76 g CO₂. Nun wurde zur Austreibung der retinierten CO₂ (s. die Untersuchung über Milchsäure) in beide Kolben je 15 ccm 10proz. HCl zugesetzt und weiter 2 Stunden geschüttelt (nach Wechsel der Barytvorlagen).

CO₂-Entwicklung aus A.: 1,01 g, aus B.: 0,22 g, auf Konto der Brenztraubensäure entfällt 0,79 g CO₂, in Summa 2,55 g CO₂. A. (Volumen 430 ccm) und B. (Volumen 500 ccm) wurden nun über je 0,5 g Kieselgur filtriert.

Von A. 60 ccm Filtrat wie in 4. weiterbehandelt; Destillat Fürth-Charnass ergibt für die Gesamtmenge 0,114 g.

Von B. 60 ccm Filtrat liefern 0,100 g für Gesamtmenge.

Ergo noch 0,114 – 0,100 = 0,014 g Brenztraubensäure im Filtrat.

Nun wurden die Inhalte beider Kolben (mit den jeweilig zugehörigen Filtrerrückständen vereinigt) mit NaOH schwach alkalisch gemacht und in fließendem Wasser durch 48 Stunden der Dialyse (s. die Untersuchung über Aminosäuren) in Pergamentschläuchen unterworfen. Die Dialysate wurden dann in Schalen eingedampft, schließlich in gewogene Schälchen gespült und nach Trocknen im Trockenschrank bei etwa 110° gewogen. Der Rückstand von A. wog im Mittel von vier Wägungen um 0,63 g mehr als der Rückstand in B.

Es läßt sich aus den angeführten Daten die folgende C-Bilanz aufstellen:

2,024 g Brenztraubensäure enthalten	0,83 g C
2,55 g CO ₂	0,69 g
0,014 g Brenztraubensäure im Filtrat	0
0,63 g + im Heferückstand zugunsten von A.	
berechnet als (C ₆ H ₁₀ O ₅) _x (Zellulose) mit	
44,4 % C	0,28 g
	0,97 g C
ergo ein Plus von . . .	0,14 g C

6. Zwei Kolben mit je 50 g Hefe und Leitungswasser :

Zusatz zum ersten 2,024 g Brenztraubensäure, genau neutralisiert; O₂-Schüttelung durch 13 Stunden und Stehen über Nacht.

CO₂-Entwicklung aus A. 2,25 g, aus B. 1,17 g, auf Konto der Brenztraubensäure 1,08 g, nach Ansäuern mit je 15 ccm HCl 10% und weiterem Schütteln durch 1¾ Stunden. CO₂-Entwicklung aus A. 1,22 g, aus B. 0,36 g, auf Konto der Brenztraubensäure 0,86 g, in Summa 1,94 g CO₂.

A. (Volumen 530 ccm) und B. (Volumen 560 ccm) wurden über je 0,2 g Kieselgur filtriert.

Von A. 60 ccm Filtrat, reduziert, und Destillat Fürth-Charnass ergeben für Gesamtmenge berechnet 0,084 g Brenztraubensäure.

Von B. 60 ccm Filtrat, wie A. behandelt, für Gesamtmenge berechnet, 0,039 g Brenztraubensäure.

Differenz 0,045 g Brenztraubensäure noch im Filtrat. Kolbeninhalte und Filtrerrückstände vereinigt, schwach sauer gemacht, zur Hintanhaltung autolytischer Veränderung aufgekocht, dann in fließendem Wasser dialysiert (50 Stunden), eingedampft und getrocknet. Der Rückstand von A. wog im Mittel von fünf Wägungen um 0,45 g mehr als der Rückstand von B. Es ergibt sich die folgende C-Bilanz:

2,024 g Brenztraubensäure	0,88 g C
1,94 g CO ₂	0,53 g
0,045 g Brenztraubensäure im Filtrat	0,02 g
0,45 g + im Heferückstand zugunsten von	
A. berechnet als (C ₆ H ₁₀ O ₅) ₂ mit 44,4 % C.	0,20 g
	0,75 g C
ergo ein Minus von . . .	0,08 g C

Obwohl die Übereinstimmung hier eine recht gute genannt werden kann, läßt die geringe Genauigkeit bei der Bestimmung des Heferückstandes immer noch die Möglichkeit offen, daß sich andere Produkte bilden; so ist speziell im Falle der Brenztraubensäure an *Acetaldehyd* zu denken, der als eine sehr leicht flüchtige Substanz unverbrannt in die Vorlagen oder auch durch dieselben hinaus entweichen könnte. Diese Erwägung führte mich dazu, die Versuchsanordnung schließlich auch auf Acetaldehyd anzuwenden. Wird dieser Stoff dabei weder in den Barytvorlagen noch in einer angeschlossenen Vorlage mit 20% NH₃ gefunden, so kann er natürlich auch nicht bei seiner eventuellen Bildung aus Brenztraubensäure auf diesem Wege entweichen.

Nachdem ein Orientierungsversuch gezeigt hatte, daß *Aldehyd bei Gegenwart von Na₂CO₃* (das ja bei der O₂-Schüttelung von brenztraubensaurem Na auftritt) *nicht* in die Vorlagen übergeht, wurde folgender Versuch angestellt.

7. Zwei Kolben mit je 50 g Hefe und Leitungswasser.

Zusatz zu A. 3 ccm einer etwa 95proz. Acetaldehydlösung (= 2,8 g CH₃COH); O₂-Schüttelung durch 10 Stunden und Stehen über Nacht. Außer den Barytvorlagen wurde bei A. noch eine Vorlage mit 100 ccm NH₃ (20%) angeschaltet, die durch Wasser gekühlt wurde.

CO₂-Entwicklung aus A. 1,80 g, aus B. 1,49 g, ergo auf Konto des Aldehyds 0,31 g CO₂, also *auffallend wenig*.

Nun wurden die Vorlagen bei A. vom BaCO₃ abfiltriert, die Filtrate mit der NH₃-Lösung vereinigt, davon ¼ durch H₂SO₄ auf 0,5% H₂SO₄

gebracht und nach *Ripper* destilliert, in die siedende Lösung wurde 0,5 % H_2SO_4 nachtropfen gelassen. Die Titration ergab für die Gesamtmenge berechnet 0,0484 g CH_3COH , es war also *keine nennenswerte Aldehydmenge* in die Vorlagen ausgetreten.

Außer dem Resultat, daß Acetaldehyd bei der O_2 -Schüttelung mit Hefe nur *in geringem Maße* unverändert in die Vorlagen entweicht (was diese Möglichkeit auch bei der Brenztraubensäure so ziemlich ausschließt), ist die *geringfügige Verbrennung* des Aldehyds im Vergleich zur Milchsäure und Brenztraubensäure interessant.

8. Wiederholung von 7. mit derselben Menge Aldehyd (2,8 g) ergab bei der O_2 -Schüttelung durch 8 Stunden und Stehen über Nacht:

CO_2 -Entwicklung aus A. 2,09 g, aus B. 1,41 g, ergo auf Konto des Aldehyds 0,68 g CO_2 , im Filtrat fand sich als Differenz von A. und B., für die Gesamtmenge berechnet, 1,07 g Aldehyd.

Auch hier geringe Verbrennung, *großer Rest im Hefefiltrat*.

Das Ergebnis der Versuche 7 und 8 erschien geeignet, einen Einblick in den Mechanismus der *oxydativen* Milchsäure- bzw. Brenztraubensäurezerstörung in Gegenwart von Hefezellen zu gewinnen, und zwar in bezug auf die Frage, ob der Acetaldehyd dabei als Zwischenprodukt auftritt oder nicht. Zu diesem Zwecke wurden noch zwei weitere Versuche ausgeführt.

9. Zwei Kolben mit je 50 g Hefe und Leitungswasser, Zusatz zu A. 6 ccm Aldehydlösung (= 4,86 g CH_3COH); bei A. hinter den Barytvorlagen noch eine Vorlage mit 20 ccm NH_3 (20 %), in Wasser gekühlt, angeschaltet; O_2 -Schüttelung durch etwa 10 Stunden und Stehen über Nacht.

CO_2 -Entwicklung aus A. 2,13 g, aus B. 0,88 g; ergo auf Konto des Aldehyds 1,25 g CO_2 .

A. (Volumen 540 ccm) und B. (Volumen 540 ccm) wurden über Kieselgur filtriert.

Von A. ergaben 25 ccm nach *Ripper* destilliert 0,171 g, daher für Gesamtmenge (540 ccm) 3,687 g Aldehyd.

Von B. ergaben 50 ccm nach *Ripper* 0,00198 g, für 540 ccm 0,021 g Aldehyd.

Ergo befanden sich noch 3,67 g Aldehyd im Filtrat.

A. Die Barytfiltrate und NH_3 vereinigt werden von BaCO_3 filtriert, 205 ccm ($\frac{1}{4}$) mit H_2SO_4 auf etwa $\frac{1}{2}$ % H_2SO_4 gebracht und nach *Ripper* destilliert 0,052 g, für Gesamtmenge 0,208 g Aldehyd, in die Vorlagen mitgerissen.

B. Bei analoger Behandlung wird nach *Ripper* kein Aldehyd gefunden.

Die C-Bilanz ergibt:

4,86 g CH_3COH	2,65 g C
1,25 g CO_2	0,34 g
3,67 g CH_3COH im Hefefiltrat	2,00 g
0,208 g CH_3COH durch den O_2 -Strom mit-	
gerissen	0,11 g
	2,45 g C
Manko	0,20 g C

Es gelang *nicht*, den fehlenden C im Heferückstand aufzufinden, womit die Tatsache einer partiellen Konsumption des Aldehyds durch die Hefe natürlich noch nicht ausgeschlossen erscheint. Wichtig ist hier wieder die *geringe Verbrennung* und der *große unangegriffene Rest* im Filtrat.

Nunmehr wurden Brenztraubensäure und Aldehyd direkt verglichen.

10. Zwei Kolben mit je 50 g Hefe und Leitungswasser; O₂-Schüttelung durch etwa 10 Stunden und Stehen über Nacht; Zusatz zu A. 3,036 g Brenztraubensäure als Na-Salz; zu B. 2 ccm Aldehydlösung (= 1,62 g C₂H₅COH); je drei Barytvorlagen und je eine Vorlage mit 50 ccm NH₃ (20 %), in Wasser gekühlt.

CO₂-Entwicklung aus A. 1,89 g, aus B. 1,38 g.

Nun wurden in beide Kolben 20 ccm HCl (10 %) zugesetzt und weiter geschüttelt (etwa 3 Stunden), nachdem die Barytvorlagen gewechselt worden waren.

CO₂-Entwicklung aus A. 1,27 g, aus B. 0,16 g, in Summa **3,16 g** bzw. **1,54 g CO₂**.

Die *ersten* Barytvorlagen mit NH₃ vereinigt, von BaCO₃ filtriert, mit verdünnter H₂SO₄ angesäuert und nach *Ripper* destilliert, ergaben:

A. für Gesamtmenge berechnet 0,006 g Aldehyd.

B. für Gesamtmenge berechnet 0,0228 g Aldehyd.

A. (Volumen 530 ccm) und B. (Volumen 560 ccm) über Kieselgur filtriert:

A. 60 ccm Filtrat, mit konzentrierter HCl auf 10 % gebracht, mit HCl (10 %) auf 300 ccm aufgefüllt, dann mit 5 g Zinkstaub reduziert und wie gewöhnlich weiter behandelt; Destillat *Fürth-Charnass* für Gesamtmenge berechnet **0,225 g Brenztraubensäure**.

B. 25 ccm Filtrat, wie gewöhnlich nach *Ripper* destilliert, für Gesamtmenge berechnet **1,87 g Aldehyd**.

Da Hefe *ohne* Zusatz bei diesem Versuch nicht verwendet worden war, kann eine exakte C-Bilanz für Brenztraubensäure und Aldehyd nicht aufgestellt werden. Doch wird die Aufstellung einer *bedingten* C-Bilanz für Brenztraubensäure durch folgende Überlegung ermöglicht. Wäre der verschwundene Aldehyd i. e. (unter Vernachlässigung der minimalen, in die Vorlagen entwichenen Menge) 1,62 — 1,37 = **0,25 g total** verbrannt, so müßte diese Menge eine CO₂-Menge von 0,50 g produzieren; dann verbliebe für die *Hefe allein* eine Produktion von 1,54 — 0,50 = 1,04 g CO₂, und auf Konto der Brenztraubensäure: 3,16 — 1,04 = 2,12 g CO₂; daraus ergäbe sich die folgende C-Bilanz:

3,036 g Brenztraubensäure enthalten	1,24 g C
maximale CO ₂ -Entwicklung 2,12 g	0,58 g
im Filtrat 0,225 g Brenztraubensäure.	0,09 g
	0,67 g C

Manko (von der Hefe konsumiert) . . **0,57 g C**

Nun einige Zahlen zum Vergleich:

1. Brenztraubensäure.

Versuch 5. Vom Gesamt-C (0,83 g) als CO₂ entwickelt 0,69 g (**83,1 %**) (abnorm hoch!), im Filtrat: 0.

Versuch 6. Von 0,83 g Gesamt-C als CO_2 entwickelt 0,53 g (63,8 %), im Filtrat: 0,02 g.

Versuch 10. Von 1,24 g Gesamt-C als CO_2 entwickelt (im Maximum!) 0,58 g (46,7 %), im Filtrat: 0,09 g.

2. Acetaldehyd.

Versuch 7. Vom Gesamt-C = 1,53 g als CO_2 entwickelt 0,08 g (5,2 %).

Versuch 8. Vom Gesamt-C = 1,53 g als CO_2 entwickelt 0,18 g (12,1 %), im Filtrat: 0,58 g (aus 1,07 g Aldehyd).

Versuch 9. Vom Gesamt-C = 2,65 g als CO_2 entwickelt 0,34 g (12,8 %), im Filtrat: 2,00 g (aus 3,67 g Aldehyd).

Versuch 10. Vom Gesamt-C = 0,88 g als CO_2 entwickelt (im Maximum!) 0,14 g (15,9 %), im Filtrat: 0,75 g (aus 1,37 g Aldehyd).

Die unter 1 und 2 angeführten Versuche zeigen deutlich, daß bei der angewandten Versuchsanordnung die Verbrennung des Acetaldehyds *in weit geringerem Ausmaße* erfolgt, als die der Brenztraubensäure¹⁾. Die CO_2 -Entwicklung bei der letzteren erfolgt *sofort* und übertrifft die aus dem Aldehyd, und zwar noch bevor die retinierte CO_2 (der Carboxylgruppe) durch HCl in Freiheit gesetzt wird (s. Versuch 10). *Daraus folgt, daß bei der geschilderten Versuchsanordnung Acetaldehyd nicht als Zwischenprodukt bei der Brenztraubensäure- oder auch Milchsäurezerstörung eine Rolle spielen kann*, was natürlich zur Carboxylasespaltung der Brenztraubensäure unter anderen physiologischen Bedingungen in keinerlei Widerspruch steht.

Zusammenfassung.

1. Brenztraubensäure kann durch Reduktion mittels Zinkstaub und HCl zu Milchsäure und Destillation der letzteren nach Fürth und Charnass bequem *quantitativ bestimmt* werden.

2. Brenztraubensäure als Na-Salz, mit einer Hefesuspension im O_2 -Strom geschüttelt, verhält sich, wie zu erwarten war, den milchsauren Salzen analog. Sie wird zum Teil, wie diese, unter reichlicher CO_2 -Entwicklung zerstört, zum Teil aber von der Hefe zum Aufbau ihrer Körpersubstanz verbraucht, obwohl der Hefe keine äußere N-Quelle zu Gebote steht.

3. Acetaldehyd zeigt eine sehr geringfügige CO_2 -Entwicklung; der überwiegende Rest verbleibt im Hefefiltrat.

4. Acetaldehyd tritt im vorliegenden Falle *nicht* als Zwischenprodukt der Milchsäure- bzw. Brenztraubensäurezerstörung auf (zum Unterschiede von den von Neuberg sichergestellten, zahlreichen Beispielen der Carboxylasespaltung von Brenztraubensäure durch tierische und pflanzliche Zellen).

¹⁾ Der Unterschied in der Versuchsdauer ist irrelevant, da die CO_2 -Entwicklung nach 8 Stunden praktisch vollendet ist.

Über den Kalkgehalt der Organe bei kalkbehandelten Katzen.

Von

W. Heubner (Göttingen) und P. Rona (Berlin).

(Eingegangen am 10. November 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bereits vor einigen Jahren veröffentlichten wir eine Mitteilung über Analysen, die die Verfolgung von injiziertem Calcium im Körper der Versuchstiere zum Ziele hatten ¹⁾. Das damalige Material war klein und unvollständig; inzwischen haben wir es so weit vergrößert, daß sichere Schlußfolgerungen möglich sind. Die Arbeit haben wir in der Weise geteilt, daß die Vergiftung, Beobachtung und Sektion der meisten Tiere in Göttingen (H.) erfolgte, die Analysen dagegen mit wenigen Ausnahmen in Berlin (R.), wohin die abgewogenen Organstücke (in Gläsern mit Glasstöpseln) gesandt wurden. Vielleicht scheint das Ergebnis die Mühe und die Kosten ²⁾ nicht zu lohnen, insofern eine Aufklärung weder über das Wesen der Calciumwirkung noch über den Verbleib des Calciums im Körper gegeben werden kann. Dennoch meinen wir, kann die Theorie der praktisch so wichtigen Calciumwirkung an den von uns ermittelten Befunden nicht vorübergehen, da sie immerhin zu einer Abkehr von geläufigen Vorstellungen zwingen.

I. Methodisches.

In der schon erwähnten früheren Arbeit hatten wir die titrimetrische Calciumbestimmung in der Form, die sie durch Jansen ³⁾ erhalten hatte, auch für feste Organe verwendet, nachdem sie sich vorher wie anderen Autoren, auch uns zu Analysen des Blutes bewährt hatte ⁴⁾. Wir haben auch weiterhin diese Methode benutzt,

¹⁾ Diese Zeitschr. **98**, 353, 1919.

²⁾ Ein Teil der Kosten wurde uns durch eine Zuwendung der Zentralstelle für Balneologie erstattet, wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **101**, 176, 1918.

⁴⁾ Diese Zeitschr. **93**, 187, 1919.

mußten jedoch die Erfahrung machen, daß ihre Zuverlässigkeit eine Grenze hat, wenn man zu kleinen absoluten Mengen des Materials heruntergeht. Der Grund dafür scheint uns darin zu liegen, daß es sehr schwer, wenn nicht praktisch unmöglich ist, absolut kalkfreie Reagenzien zu erhalten; vor allem das bei der Methode erforderliche *Eisenchlorid* ist in dieser Hinsicht bedenklich. Man erhält also nach *Jansen* wohl stets eine Calciummenge, die etwas *größer* ist als die in dem untersuchten Organ tatsächlich enthaltene, eben vermehrt um eine kleine Spur aus den Reagenzien. Der Fehler kann — wenigstens für alle Vergleichsbestimmungen — vernachlässigt werden, wenn die absolute Menge des Organkalkes groß genug ist, d. h. wenn ein genügendes Quantum des Organs zur Analyse genommen wird; nach unseren Erfahrungen halten wir alle Analysen an weniger als 5 g frischen Organs für unbrauchbar und nur solche von 10 g aufwärts für hinreichend zuverlässig. Im Verlaufe unserer Untersuchungen sind wir daher zu immer größeren Materialmengen für die Analysen übergegangen; dadurch wurde naturgemäß die *Zahl* der verfügbaren Organe eingeschränkt. Viele Analysen, die wir im Anfang ausgeführt hatten (z. B. von Galle, Sehnen, Arterien, Haaren u. dgl.) mußten wir ganz verwerfen. Ausreichend waren bei allen Tieren nur Muskeln, Leber, Darm, Gehirn und Nieren; andere Organe nur ausnahmsweise hier und da.

Alle Werte, die wir bei Verwendung hinreichender Materialmengen von dem gleichen Organ eines einzelnen Tieres erhielten, liegen im allgemeinen nahe beieinander, obwohl auch dann noch gelegentlich Differenzen vorkamen, die sich 50 % annäherten und merklich größer waren als bei Parallelanalysen desselben *Blutes*. Ohne unsere Analysengenauigkeit überschätzen zu wollen, für die wir 20 % größten Fehler ruhig zugeben wollen, glauben wir doch auch eine *Verschiedenheit* des Kalkgehaltes an verschiedenen Stellen desselben Organs (Leber) oder in verschiedenen gleichartigen Organen (Muskeln) annehmen zu müssen. Auch dies ist uns erst während der Untersuchung selbst deutlich geworden und daher fehlen in unseren früheren Versuchen die mehrfachen Parallelanalysen, durch die wir uns später zu sichern suchten.

Eine Fehlerquelle besonderer Art ist natürlich beim *Gehirn* durch die Möglichkeit gegeben, daß bei der Eröffnung des Schädels Knochensplitterchen unbemerkt in die Hirnmasse eingedrückt werden; doch wurde stets an diese Möglichkeit gedacht und unter sorgfältiger Inspektion des herausgenommenen Gehirns danach getrachtet, diesen Fehler zu korrigieren.

Die Organe wurden, wie früher, möglichst frisch entnommen und als Ganzes, sowie abgeteilt für die Analysen gewogen; dabei wurde meist eine bestimmte Reihenfolge innegehalten, ferner die Zeit ver-

merkt, die seit der Tötung des Tieres oder Beginn der Sektion verfloßen war; so wurden Verschiedenheiten des Wasserverlustes weitgehend vermieden und nebenher ein recht zuverlässiges Zahlenmaterial über die Organgewichte der benutzten Tierart gewonnen, das auch unabhängig von den Kalkanalysen gelegentlich von Wert sein kann (vgl. diese und folgende Seiten).

Die Kalkbehandlung erfolgte stets durch *subkutane* Injektion von Calciumchloridlösungen mit 2 bis 5 Proz. des wasserhaltigen Salzes (während wir in der früheren Arbeit *intravenöse* Injektion verwandt hatten). Die lokalen Schädigungen an den Injektionsstellen nahmen wir in Kauf, da wir auch den Erfolg *wiederholter*, selbst mehr- und vieltägiger Kalkbehandlung zu prüfen wünschten. Natürlich wurde bei Entnahme von Muskel oder Haut zum Zweck der Analyse peinlich darauf geachtet, daß das Gewebe außerhalb der unmittelbar von den letzten Injektionen getroffenen Gebiete lag.

Die Mengen des injizierten Calciumsalzes bewegen sich zwischen tödlichen Dosen und großen Bruchteilen davon; natürlich ist bei mehrfachen Injektionen auch der *Zeitfaktor* mit in Rechnung zu setzen.

II. Organgewichte.

Auf Tabelle I finden sich die Gewichte der frischen Organe unserer Katzen zusammengestellt, und zwar ausgedrückt in Promillen ihres Körpergewichts. Dabei sind zunächst gesunde Tiere von normalem Habitus abgetrennt, die durch Entbluten getötet waren (A), weiterhin ebensolche, jedoch mit Calcium behandelte Tiere (B). Ein merklicher Unterschied besteht zwischen beiden Gruppen nicht. Auch die nicht verbluteten Tiere (C) ordnen sich den gleichen Zahlenbereichen ein. Zwei Beispiele eines abgemagerten und eines gemästeten Tieres beleuchten die bekannte Tatsache, daß die parenchymatösen Organe (Leber, Nieren, Herz) an dem Fettverlust bei Abmagerung starken Anteil haben, das Gehirn jedoch nicht; umgekehrt verfetten die inneren Organe bei übermäßiger Fütterung nicht in gleichem Grade wie der Gesamtkörper.

Tabelle II gibt einen Überblick über die von uns an Katzenorganen gefundenen Variationen; dabei sind die Daten aus unserer früheren Arbeit mit berücksichtigt. Die Schwankungen sind auch an der *Lunge* größer, als uns damals gesetzmäßig schien; *Laqueur* und *Magnus* geben als Normalgewicht der Katzenlungen 7 bis 8 g pro Kilogramm an ¹⁾.

¹⁾ Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 13, 38, 1921.

Tabelle I.

Organgewichte in Grammen je Kilogramm Körpergewicht.

Versuchsnummer	Körpergewicht kg	Besondere Merkmale	Leber	Gehirn	Nieren	Lungen	Herz	Milz
A. 7	1,90	gesund, normaler Habitus, entblutet	23,0	—	6,0	6,0	4,6	1,5
4	1,94		32,3	14,7	6,3	8,4	4,0	1,7
5	2,50		25,4	10,4	7,3	—	—	1,6
1	2,50		26,2	10,8	—	—	—	—
2	3,07		30,2	9,3	9,1	—	—	3,2
B. 18	2,12	normaler Habitus, mit Calcium behandelt, entblutet	31,0	11,2	8,5	7,2	4,2	1,6
14	2,20		29,6	11,5	6,6	7,3	4,9	1,0
17	2,25		33,5	—	7,5	8,0	4,2	1,5
16	2,80		26,5	10,8	8,0	—	—	—
C. 3	2,74	normaler Habitus ohne Verblutung gestorben	28,2	10,5	10,8	—	—	—
12	3,00		26,4	9,2	—	5,6	—	2,1
15	2,50		27,4	10,0	8,2	—	—	—
6	1,42	abgemagert	20,2	16,8	5,8	8,5	3,8	0,7
13	2,85	ziemlich fett	26,3	8,6	5,2	4,1	3,4	1,2
Mittel der Reihe A (normal, entbl.)			27,4	11,3	7,2	7,2	4,3	2,0
" " " B (Ca, entblutet)			30,2	11,2	7,7	7,5	4,4	1,4
" " " C (nicht ")			27,3	9,9	9,5	—	—	—
Gesamtmittel			27,6	11,2	7,4	6,9	4,1	1,6

Tabelle II.

Variationsbreite der Organgewichte (in Promille des Körpergewichts).

Organ	Zahl der untersuchten Katzen	Minimum	Maximum	Mittel
Leber	14	20,2	33,5	27,6
Gehirn	17	5,4	16,8	10,7
Nieren	12	5,2	10,8	7,4
Lungen	13	4,1	8,5	6,8
Herz	7	3,4	4,9	4,1
Milz	10	0,7	3,2	1,6

Tabelle III.

Verhältnis der beiden Nieren (in Grammen).

Versuchsnummer	Linke Niere	Rechte Niere
2	14,19	13,81
12	10,36	10,21
16	11,27	11,17

In einigen Versuchen wurden rechte und linke Niere gesondert gewogen: die linke war stets ein klein wenig schwerer als die rechte, wie Tabelle III verzeichnet. Im Versuch 3 wurde dem lebenden Tier die linke Niere (nach Abbinden der Gefäße) extirpiert; sie wog 15,58 g, dagegen die rechte aus der Leiche des bei der Operation gestorbenen Tieres nur 14,76. Die lebende Niere enthält also so viel Blut mehr als die Leichenniere, wie etwa 3% ihres Gewichtes entspricht.

Es ist nicht uninteressant, diesem Befunde einen analogen von der Lunge gegenüberzustellen, der bei einer früheren Gelegenheit erhoben wurde: es zeigte sich, daß die lebende Lunge etwa 35 % ihres Gewichtes mehr an Blut enthält als die Leichenlunge¹⁾.

In einer Reihe von Versuchen wurden (mit Mikrokjeldahl) Stickstoffbestimmungen in Proben der Organe vorgenommen, die den Zweck verfolgten, etwaige Unterschiede des Wassergehaltes der frischen Organe aufzudecken. Tabelle IV gibt eine Übersicht der erhaltenen Werte.

Tabelle IV.
Stickstoffgehalt in frischen Organen (%).

Versuchs- nummer	Körper- gewicht kg	Besondere Merkmale	Leber	Gehirn	Niere	Lunge	Herz	Milz	Muskel	Dünndarm	Enddarm	Haut	Haare
A. 7	1,90	gesund, normaler Habitus, entblutet	3,39	1,79	2,72	2,93	2,72	—	3,30	—	—	3,95	12,96
5	2,50		3,27	1,72	(2,50)	(1,99)	—	—	3,22	—	—	2,97	13,26
8	?		2,65	1,94	2,38	—	3,05	2,98	3,65	—	—	(7,12)	—
B. 14	2,20	norm. Habitus, m. Ca behandelt, entblutet	2,92	1,87	(1,63)	2,12	—	—	2,66	—	—	3,86	13,36
17	2,25		2,94	1,91	2,65	—	2,99	2,95	2,97	—	—	3,63	—
6	1,42	abgemagert	1,77	1,91	2,72	3,02	2,84	—	2,82	—	—	3,84	13,32
13	2,85	ziemlich fett, Ca	3,86	2,01	—	2,80	—	—	3,54	2,87	2,76	3,95	—

Es zeigt sich, daß in der Tat ziemlich erhebliche Differenzen des Stickstoff-, also Eiweißgehalts vorkommen, ohne daß ein Grund dafür angebbar ist. Sehr konstant sind nur die Zahlen für die lebenswichtigsten Organe, Gehirn und Herz; nehmen wir für das Gehirn die in unserer früheren Arbeit ermittelten Werte hinzu, so kommen wir bei 11 Versuchstieren zu einer Schwankungsbreite von 1,72 bis 2,05 % N; da wir früher in Parallelversuchen am gleichen Gehirn ebenfalls Differenzen bis zu 0,3 % N fanden, so bedeuten die Zahlen eine große Konstanz von Individuum zu Individuum. Im Versuch 6 diente zur Analyse ein Stück des Großhirnlappens, im Versuch 7 eine Querscheibe aus der Gegend der Vierhügel: auch verschiedene Gehirnteile weisen also konstante Stickstoffwerte auf.

Die bei Muskeln erhaltenen Differenzen sind nicht durch verschiedene Muskelarten zu erklären: denn die analysierten Stücke entstammten stets dem Oberschenkel (Quadriceps). Auch die Annahme eines etwa ver-

¹⁾ *Gildemeister und Heubner, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med.* 18, 318, 1921.

schiedenen Wasserverlustes der Organe bei der Präparation ist zurückzuweisen. Denn die Zeiten der Entnahme der Proben nach dem Tode des Tieres sind meist sehr ähnlich (vgl. Tabelle V). Die Organe enthalten also *während des Lebens* auf gleiche Stickstoffmengen verschiedene Mengen Gesamtsubstanz, also wohl auch auf gleiche Eiweißmengen verschiedene Mengen *Wasser*.

Tabelle V.

Stickstoffgehalt der frischen Organe im Verhältnis zur Dauer und Temperatur der Präparation.

Versuchsnummer	Organ	Zeitraum zwischen Tod des Tieres und Entnahme der Analysenprobe	Datum der Präparation	Stickstoffgehalt in % des frischen Organs
6	Leber	24 Minuten	22. 9. 19	1,77
8	"	84 "	2. 8. 19	2,65
7	"	85 "	27. 9. 19	3,39
13	"	141 "	14. 1. 20	3,86
14	Muskel	44 "	5. 11. 19	2,66
6	"	30 "	22. 9. 19	2,82
13	"	42 "	14. 1. 20	3,54
8	"	25 "	2. 8. 19	3,65
14	Lunge	95 "	5. 11. 19	2,12
6	"	129 "	22. 9. 19	2,93
5	Haut	44 "	9. 10. 19	2,97
7	"	21 "	27. 9. 19	3,95
13	"	29 "	14. 1. 20	3,95

Einige der Zahlen von Tabelle IV sind eingeklammert und bedürfen der Erläuterung: Im Versuch 5 und 14 kam nicht wie sonst eine Querscheibe der Niere mit Mark und Rinde zur Analyse, sondern *reine Rinde*. Ferner war im Versuch 5 die Lunge merklich ödematös. — Die Haut wurde nur im Versuch 8 zusammen mit ihren Haaren analysiert; sonst waren die Tiere während des Lebens bereits sorgfältig durch Strontiumsulfid (im Versuch 6 durch Rasieren) auf dem Bauche und den angrenzenden Flächen der Oberschenkel enthaart worden und diese haarlose Haut zur Analyse verwandt. Haare wurden aus einer sauberen Stelle des Pelzes herausgeschnitten, im Versuch 14 noch durch Schütteln in Äther gereinigt.

III. Blutkalk.

Bei einer Anzahl der untersuchten Tiere wurden auch Blutproben (stets 10 ccm) analysiert. Die erhaltenen Werte gibt Tabelle VI. Das Mittel von vier Normaltieren beträgt 10,9 mg-Proz. Ca O bei einer Schwankungsbreite von 10,5 bis 11,9. In unserer ersten Arbeit¹⁾ hatten wir an 16 gesunden Tieren Werte zwischen 9,5 und 14,3 bei einem Mittel von 11,2 gefunden. (Dabei ist entsprechend unseren neuen Erfahrungen — vgl. oben S. 249 — eine Analyse nicht mitgezählt, bei der weniger als 10 ccm verwendet worden waren).

¹⁾ Diese Zeitschr. 98, 187, 194, 1919.

Tabelle VI.

Blut.

Reihe	Versuchsnummer	Vorbehandelt mit g CaO je kg			Zeitraum zwischen letzter Calciuminjektion und Tod	mg-% CaO im Blute
		Einzeldosen	Gesamtdosis	während Tagen		
A.	7	—	—	—	—	10,7
	5	—	—	—	—	11,9
	1	—	—	—	—	10,5
	2	—	—	—	—	9,4
	2	—	—	—	—	11,7
B.	20	0,013—0,019	0,16	42	10 Tage	12,4 12,1
	19	0,013—0,019	0,18	49	6 Tage	9,8 1,00
	17	0,02	0,18	9	23 Stunden	11,5
	14	0,023	0,07	2	5 Stunden	12,0
C.	16	0,025—0,053	0,13	1	2 Stunden	15,2
Mittel der Reihe A . .						10,9
Mittel der Reihe B . .						11,9

Der im Versuch 16 gefundene Wert von 15,2 mg-Proz. CaO 2 Stunden nach der letzten subkutanen Injektion einer hohen Calciumdosis stimmt ebenfalls mit unseren früheren Befunden aufs beste überein. Wir hatten an vier Tieren in dem Zeitraum von $\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Stunden nach gleicher Vorbehandlung im Mittel 15,4 gefunden¹⁾. Eine Ergänzung liefert dieser Versuch jedoch insofern, als Calcium nicht nur durch *einmalige* Injektion — wie früher (entsprechend 0,045 bis 0,067 g CaO pro Kilogramm) —, sondern in vier Injektionen während 21 Stunden zugeführt wurde, im ganzen 0,13 g CaO pro Kilogramm. Es zeigt sich, daß auch eine solche „Anreicherung“ des Körpers mit Calcium nicht imstande ist, den Calciumgehalt des *Blutes* höher zu treiben als eine einmalige subkutane Injektion. Die in diesem Falle angewandte Dosis war nicht sehr weit von der tödlichen entfernt: ein anderes Tier ging nach einer im Laufe von 21 Stunden verabreichten Dosis von 0,17 g CaO pro Kilogramm zugrunde.

Bei dieser Sachlage ist es nicht erstaunlich, daß bei Anwendung kleinerer Dosen auch während eines längeren Zeitraums *keine* Erhöhungen des Blutkalks zu finden sind, wofür Versuch 14 und 17 Belege sind; allerdings geschah die Untersuchung so lange Zeit nach der letzten Injektion, daß auch nach einmaliger größerer Dosis keine Erhöhung des Blutkalks mehr zu finden gewesen wäre²⁾. Um so mehr

¹⁾ Diese Zeitschr. 93, 201, 1919.

²⁾ Vgl. unsere frühere Arbeit, ebendasselbst 93, 201 ff.

wird die Tatsache ins rechte Licht gestellt, daß eine bleibende Anreicherung des Blutes an Calcium durch Dauerzufuhr erträglicher Kalkmengen *nicht* eintritt. Die Versuchstiere 19 und 20, die sehr milde, wenn auch während einer langen Zeitperiode mit Calcium behandelt und erst nach einem mehrtägigen Intervall zur Untersuchung kamen, sind natürlich eher Normaltieren als Calciumtieren gleichzusetzen.

Bei dieser Gelegenheit sei es erlaubt, mit einigen Worten auch auf unsere früheren Untersuchungen an *Serum* zurückzukommen. Nach den oben angeführten Erfahrungen über die Analyse geringerer Substanzmengen scheinen uns eine Reihe der damals angegebenen Zahlen revisionsbedürftig. Von Normaltieren besitzen wir nur zwei Analysen, die an 10 ccm Serum ausgeführt wurden: sie ergaben die Werte 15,2 und 15,6 mg-Proz. CaO; berücksichtigen wir jedoch noch alle Werte bis herab zu 7,5 ccm angewandten Serums, so hatten wir unter neun gesunden Tieren das Mittel 16,0 mg-Proz. bei einer Schwankungsbreite von 14,4 bis 16,8, und bei vier trächtigen oder kranken Tieren das Mittel 15,6 (14,1 bis 17,0). Die übrigen höheren Werte (bis 20,3) möchten wir heute als fehlerhaft ansehen.

Auch von den Serumanalysen nach Kalkbehandlung¹⁾ würden wir heute einige Werte streichen. Doch wird dadurch das Gesamtergebnis nicht verändert, ebensowenig unsere Schlußfolgerungen über das Verhalten der Blutkörperchen, so daß es sich nicht lohnt, die Zahlen im einzelnen zu diskutieren.

IV. Organkalk.

A. Normalzahlen.

Die Grundlage für die Beurteilung des Effekts von Kalkinjektionen auf den Kalkgehalt der Gewebe müssen natürlich hinreichend begründete Daten über den *normalen* Kalkgehalt liefern. Wir haben daher eine Anzahl unbehandelter Katzen durch Verbluten aus der Carotis getötet und die Organe analysiert.

a) Muskeln.

In Tabelle VII finden sich zunächst eine Anzahl Versuche verzeichnet, in denen *mehrere* Muskeln desselben Tieres zur Analyse kamen. Sie liefern zugleich ein Material, das über die Genauigkeit der angewandten Methode Aufschluß gibt.

Betrachtet man zunächst *gleiche, symmetrische* Muskeln beider Körperhälften unter der Voraussetzung, daß sie bezüglich ihres Kalkgehalts auch als *gleich* anzusehen sind, so ergibt sich in vier Doppelanalysen des Versuchs 1 ein größter Fehler von 18 %, ein mittlerer Fehler von 7 %. Bei den verschiedenen Muskelpaaren überschneiden sich die Einzelwerte nicht; die Ergebnisse scheinen vielmehr auf verschiedenen Kalkgehalt der Muskeln zu deuten: Quadriceps 4,5; Adduktoren 5,0; Biceps 5,3; Wade 5,6. Dennoch kann dies Zufall sein. Im Versuch 3 wurde ein langer Rückenmuskel

¹⁾ Vgl. Tabelle diese Zeitschr. 98, 201.

Tabelle VII.

Normaltiere, Muskeln.

Versuchs- nummer u. Körpergew. kg	Vorgeschichte u. dgl.	Art des Muskels	Zur Analyse ent- nommen		Gefunden mg-% CaO
			g	Minuten n. dem Tode	
1 2,50	Seit drei Monaten im In- stitut gefüttert, völlig normal, seit 15 Stunden nüchtern; entblutet	r. Quadriceps . .	20,05	25	4,9
		l. " . .	23,20	33	4,1
		r. Adduktoren . .	16,58	42	4,9
		l. " . .	16,11	38	5,1
		r. Biceps femoris	17,60	50	5,2
		l. " . .	15,49	46	5,4
		r. Wade	15,19	54	5,7
		l. "	16,67	59	5,5
2 3,07	Seit 14 Tagen eingebracht, z. T. mit Pferdefleisch, z. T. mit Küchenabfällen gefüttert, völlig normal; entblutet	Querscheibe aus l. Adduktor + Flexor femoris .	10,75	210	11,4
		Stück aus r. Glu- tæus maximus .	15,95	224	11,2
3 2,74	Kater; stirbt im Augen- blick einer Amputation des l. Femur, nachdem ihm bereits bei der glei- chen Operation (nach 2,5 g Urethan) die l. Niere ex- stirpiert und 40 ccm Blut aus der A. femoralis ent- nommen war	r. Adduktoren . .	23,16	265	7,0 ¹⁾
		r. Wade	14,74	257	7,5 ²⁾
		l. Rückenmuskel, oberes Stück . .	13,23	275	5,8 ²⁾
		derselbe, unteres Stück	12,23	279	7,2 ¹⁾
15 2,50	Rechter Femur in Äther- narkose amputiert	r. Quadriceps und Adduktor . . .	15,15	160	8,5
		Beuger d. r. Ober- schenkels . . .	15,35	167	9,6
		r. Unterschenkel .	16,21	177	9,5
16 2,80	Seit drei Wochen im In- stitut gefüttert, r. Ober- schenkel in Äthernarkose amputiert	r. Quadriceps . .	15,70	135	8,3
		r. Adduktoren . .	19,28	142	7,1
		r. Wade	16,80	156	12,0

durchgeteilt und das obere Stück von einem anderen Untersucher analysiert als das untere: die Ergebnisse liegen mit 5,8 und 7,2 % um 22 % auseinander; hier ist gewiß nicht zu unterscheiden, ob Verschiedenheiten des Objekts oder nur methodische Fehler vorliegen. Im Versuch 16 wurde für die Wadenmuskulatur ein erheblich höherer Wert ermittelt als für die Oberschenkelmuskeln; will man diesen Wert nicht als Zufallsfehler größerer Art verwerfen, wofür kein Grund vorliegt, so spricht er stark für das Vorkommen *wechselnden* Kalkgehalts in der Muskulatur desselben Tieres.

Vergleicht man die Mittelzahlen sämtlicher Analysen bei den fünf verschiedenen Individuen miteinander, so erhält man die Werte

¹⁾ In Göttingen analysiert.

²⁾ In Berlin analysiert.

5,1; 11,3; 6,9; 9,2 und 9,1 mg-Proz. Ca. Sie liegen ganz sicher weiter auseinander, als es methodische Fehler erklären könnten. Die Schlußfolgerung auf einen wechselnden Kalkgehalt in der Muskulatur verschiedener Individuen wird weiter gestützt durch diejenigen Analysen, in denen wir jeweils nur *eine* Muskelprobe, stets vom Quadriceps, untersuchten. Die Ergebnisse finden sich auf Tabelle VIII, auf der die Mittelzahlen aus Tabelle VII nochmals mit aufgenommen sind.

Tabelle VIII.

Normaltiere, Muskeln.

Versuchsnummer	Körpergewicht kg	Zur Analyse entnommen		Gefunden mg./% Ca O
		g	Minuten n. dem Tode	
1	2,50	(Mittelzahl:)		5,1
2	3,07	,,		11,3
3	2,74	,,		6,9
15	2,50	,,		9,2
16	2,80	,,		9,1
4	1,94	14,80	24	10,7
5	2,50	9,40	51	26,5
6	1,42	(6,09)	25	(17,8)
7	1,90	9,92	32	8,8
8	?	(5,87)	22	(12,0)
9	?	9,99	?	8,7
10	?	?	?	(6,9)
11	?	?	?	(7,0)
Mittel				10,8
Mittel unter Ausschl. der eingekl. Zahlen				10,7

Die Tiere Nr. 4, 5, 6 waren seit Monaten im Göttinger Institut mit gemischter Kost gefüttert worden, davon nur Nr. 6 nicht ganz normal, insofern es in der letzten Woche vor dem Tode schlecht gefressen hatte und stark abgemagert war; alle Tiere (außer Nr. 3, 15, 16) waren durch Verbluten getötet.

Auch bei strengster Vorsicht in der Bewertung der erhaltenen Zahlen wird man nicht umhin können, eine Schwankungsbreite um *mindestens das Doppelte*, wenn nicht das *Mehrfache* anzuerkennen. Besonders häufig kommen allerdings Zahlen zwischen 7 und 9 mg-Proz. vor. Man wird in dieser Höhe ein gewisses Normalmaß erblicken können; sicher gibt es nicht das *Minimum* an, das mit gesunden Funktionen vereinbar ist, wie der Fall 1 beweist. Andererseits kann über das Normalmaß hinaus Calcium in erheblichen Mengen (als Reservevorrat?) aufgespeichert werden.

b) Leber.

Die Übersicht der Zahlen (vgl. Tabelle IX) liefert dasselbe Bild wie bei den Muskeln: Differenzen von Individuum zu Individuum,

Tabelle IX.

Normaltiere, Leber und Gehirn.

Versuchs- nummer	Leber			Gehirn			
	Zur Analyse ent- nommen		Gefunden mg-% CaO	Zur Analyse ent- nommen		Gefunden mg-% CaO	
	g	Minuten n. dem Tode		g	Minuten n. dem Tode		
1	17,23	102	5,6	r. Hälfte	13,29	98	7,3
	17,85	114	5,0	l. Hälfte	12,67	100	7,0
	13,84	118	6,4				
2	6,04	274	12,8	Schoibe aus Groß- u. Mittelhirn +			
	9,86	285	12,8	Stück Kleinhirn	9,52	238	5,0
				Rest des Hirns .	19,02	240	6,3
3	16,45	304	6,2	r. Hälfte	14,35	350	11,0
	15,95	307	6,8	l. Hälfte	14,46	352	10,1
4	9,61	227	9,0	Frontalscheibe .	7,86	295	7,9
5	9,43	105	10,8	l. Großhirnhälfte	10,20	100	21,4
6	8,23	82	15,4	Frontalscheibe .	7,72	41	20,0
7	8,21	80	11,2	vorderes Großhirn	(5,26)	55	(23,2)
8	13,27	80	14,6	Frontalscheibe .	7,67	47	21,9
9	9,67	?	18,8				
	6,60	?	10,6				

die bis zum *Dreifachen* gehen und auch bei Parallelanalysen an *derselben* Leber zuweilen Unterschiede, die über die methodischen Fehler hinauszugehen scheinen. Ob die starke Differenz im Versuch 9 reell ist, mag dahingestellt bleiben; immerhin ist bemerkenswert, daß die Abweichung *entgegengesetzt* ist, als dem üblichen Fehler entsprechen würde, insofern bei der *kleineren* Substanzmenge kein größerer, sondern ein erheblich geringerer Kalkwert gefunden wurde. — Bei der Beurteilung der gefundenen Differenzen darf man sich bewußt bleiben, daß gerade in diesem Organ wohl gelegentlich lokale Verkalkungen kleiner pathologischer Herde vorkommen mögen.

Das gefundene Calcium *minimum* liegt nahe dem Minimum in der Muskulatur bei 5 bis 6 mg-Proz. CaO.

e) Gehirn.

Auch beim Gehirn sind die Differenzen von Individuum zu Individuum sehr groß, während sie bei den drei Parallelanalysen nur bis zu 20% gehen. Schon früher hatten wir Schwankungen von 11 bis 24 mg-Proz. bei fünf Individuen beobachtet¹⁾. Trotz der dadurch gebotenen Vorsicht, daß die Eröffnung des Schädels Körnchen von Knochensubstanz unbemerkt in die Hirnmasse bringen könnte,

¹⁾ Diese Zeitschr. 98, 357, 1919.

verdient der Befund Beachtung, vor allem im Zusammenhang mit den vorher behandelten Organen, bei denen die gleiche Gefahr nicht besteht.

An den Differenzen bis zu 100% in den Versuchen 1, 2 und 3 ist ja auf keinen Fall zu zweifeln.

Das *Minimum* liegt ebenso hoch wie bei Muskel und Leber, nämlich bei 5 bis 6 mg-Proz. CaO. Bemerkenswert ist die Erscheinung, daß das Minimum nicht für alle drei Organe bei dem *gleichen* Individuum gefunden wurde; zwar ist Nr. 1 auch noch durch einen recht niedrigen Wert ausgezeichnet, doch lehrt ein Vergleich von Nr. 2 und 3 auf Tabelle IX, wie die Einzelorgane bezüglich des Kalkwertes ihre Selbständigkeit behaupten.

d) Niere.

In dem Ausscheidungsorgan Niere wird man a priori weit eher stärkere Differenzen des Kalkgehalts erwarten als in den übrigen Organen, zumal eingedenk mancher pathologisch-histologischer Befunde einer sichtbaren Ausscheidung von Kalksalzen in Zellen oder Kanälchen. Doch weichen die gefundenen Zahlen (Tabelle X) nicht

Tabelle X.
Normaltiere, Nieren.

Versuchsnummer	Zurichtung des Organs	Zur Analyse entnommen		Gefunden mg-% CaO
		g	Minuten n. dem Tode	
10	ganze linke Niere	?	?	8,4
	ganze rechte Niere	?	?	6,9
11	ganze linke Niere	?	?	6,6
	ganze rechte Niere	?	?	8,1
4	Rinde (Mark ausgeschält)	7,76	257	10,8
5		5,98	127	12,6
8		7,56	105	17,9
9	Rinde und Mark	9,89	?	11,5
	Rinde (Mark ausgeschält)	9,76	?	5,8
2	rechte Niere, Rinde z. T. abgeschält	10,40	308	13,2
	linke Niere, Mark ausgeschält . . .	9,93	300	8,6
3	linke Niere, dem lebenden Tiere exstirpiert, lehmgelb gefärbt, Teil der Rinde abgeschält	13,08	—	9,5
	rechte Niere, der Leiche entnommen, braun gefärbt (wie Milchsokolade), Mark ausgeschält	12,98	312	9,3

stärker voneinander ab, als in den bisher besprochenen Organen. Zwischen rechts und links sind die Unterschiede nicht größer als 20%, können also durch methodische Fehler vorgetäuscht sein.

Dagegen ist in den Versuchen 2 und 9 der Unterschied zwischen reiner Rinde und einem Stück markhaltigen Nierengewebes sehr beträchtlich, so daß das Mark calciumreicher als die Rinde erscheint; im Versuch 3 tritt dies allerdings nicht zutage. Unsere etwas weiter gehende Angabe auf dem Pharmakologentag in Freiburg¹⁾ ist demnach einzuschränken.

e) Darm.

Das zweite, fast wichtigere Exkretionsorgan für den Kalk ist bekanntlich der Darm, beim Menschen vor allem der Dickdarm. Wie weit der kurze Enddarm des Fleischfressers dem menschlichen Dickdarm funktionell entsprechen mag, ist wohl noch recht ungewiß. Unsere Zahlen sprechen jedoch entschieden dafür (vgl. Tabelle XI):

Tabelle XI.
Normaltiere, Darm.

Versuchsnummer	Teil und Zurechtung des Organs	Zur Analyse abgewogen		Gef. $\frac{\text{mg CaO}}{\text{g}}$	
		g	Minuten n. dem Tode		
1	Dünndarm, durch energisches Ausstreichen v. Inhalt (Würmern) befreit, d. oberen zwei Drittel vom Pankreas abwärts in 4 Stücke zerlegt.	oberst. Stck.	15,27	70	15,1
		zweites "	14,54	74	14,9
		drittes "	12,83	79	10,9
		viertes "	13,77	83	11,9
2	Dünndarm mit Inhalt (Bandwurm) in 5 Stücke zerschnitten, beginnend 10 cm unterhalb d. Pankreas. Gewicht des Stückes Nr. 2: 26,61; Nr. 4: 8,75.	oberstes "	12,08	242	26,8
		drittes "	6,21	252	23,1
		fünftes "	16,87	258	12,0
3	Dünndarm; 2 Stücke v. je 20 cm Länge werden abgetrennt, das erste etwa 25, d. zweite etwa 65 cm unterhalb d. Pankreas beginnend; die Stücke werden aufgeschnitten, mit Wasser gewaschen und mit Fließpapier abgetupft.	oberes "	14,33	284	23,7
		unteres "	14,00	288	13,8
9	Dünndarm	9,95	?	16,4	
	"	12,05	?	12,5	
	Enddarm	10,00	?	44,3	

denn im Versuch 9 liegt der Kalkgehalt des Enddarms wesentlich höher als der des Dünndarms, und überdies berühren die höchsten Dünndarmwerte der drei anderen Tiere nur eben die niedrigsten der

¹⁾ Verh. d. Deutsch. pharmakol. Ges. Nr. 1, S. XXV.

fünf von uns früher ermittelten Werte für die vom Inhalt befreite *Wand* des Enddarms (25 bis 39 mg-Proz. CaO). Interessant ist der Befund, daß im Verlaufe des Dünndarms die *oberen* Abschnitte kalkreicher zu sein scheinen als die unteren; vielleicht ist dies der Ausdruck für die dort lebhaftere *Resorption* (?).

f) Lunge.

In unserer früheren Arbeit hatten wir an fünf Tieren viermal Werte zwischen 24 und 35 mg-Proz. CaO und nur einmal 17 gefunden; diesmal liegen bei vier Tieren dreimal die Werte zwischen 25 und 32 mg-Proz. CaO. Der eine Fall (3), bei dem die Zahlen niedriger liegen (und wenig gut übereinstimmen), war in einer schweren Operation zu Tode gekommen; die Lunge wog etwas mehr als normal (10,6 g je Kilogramm) und wies einige gerötete Flecken auf; sie war also wohl schon reicher an Blutflüssigkeit als ein ganz gesundes Organ. In einem anderen Versuche (5), der nicht mit in die Tabelle aufgenommen wurde, fand sich — wohl infolge einer Schwefelwasserstoffvergiftung nach Behandeln der Haut mit Strontiumsulfid — bei der Sektion Schaum in der Luftröhre, Ödem und Hämorrhagien im Lungengewebe und ein Lungengewicht von 14,0 g je Kilogramm; hier fanden sich in 6,44 g frischen Lungengewebes auch nur 17,5 mg-Proz. CaO vor.

Sicherlich ist also die gesunde Lunge wesentlich reicher an Calcium als das Blut und die Blutflüssigkeit, während die meisten anderen Organe *ärmer* daran sind oder wenigstens sein können. Wird das Lungengewebe jedoch von pathologischen Mengen Blut und seröser Flüssigkeit durchsetzt, so sinkt sein relativer Gehalt an Calcium.

g) Herz.

Der Herzmuskel zeigt — wenigstens in den vier untersuchten Fällen — so ziemlich die beste Konstanz an Calcium unter allen Organen, die Schwankungsbreite beträgt nicht mehr als 38% des Mittelwertes. Ein Blick auf frühere Tabellen (z. B. VIII, Skelettmuskeln) lehrt, daß diese vier Fälle durchaus nicht die gleiche Konstanz bei anderen Organen aufweisen.

Wegen der *Milz* vgl. Tabelle XII.

Man könnte versucht sein, die bekannte funktionelle Bedeutung des Calciums für das Herz mit der gefundenen relativen Konstanz in diesem Organ in Beziehung zu setzen. Dann erhebt sich aber sofort die Frage, ob denn nicht Zentralnervensystem und Skelettmuskulatur in durchaus ähnlicher Weise vom Calcium beeinflusst werden. Selbst wenn man alle höheren Werte vom Gehirn als fehler-

Tabelle XII.
Normaltiere, Lunge, Herz, Milz.

Versuchsnummer	Organ	Zur Analyse abgewogen		Gefunden mg ^{0,10} Ca O
		g	Minuten n. dem Tode	
3	Lunge	12,25	340	17,8
	„	13,26	342	13,6
4	„	7,84	277	26,1
6	„	(4,48)	132	(25,0)
9	„	9,95	?	32,4
4	Herz	7,27	268	14,2
5	„	11,85	152	11,2
8	„	6,95	114	16,3
9	„	11,15	?	12,6
2	Milz	9,97	294	9,5
9	„	5,32	?	13,5

haft verwerfen wollte, blieben noch immer die starken Variationen in der Muskulatur zu deuten. Daß es sich viel wahrscheinlicher um einen *Zufall* handelt und das Herz keine Ausnahme gegenüber den übrigen Organen bildet, dafür sprechen Befunde, von denen unten (S. 271) die Rede sein wird.

B. Calciumtiere.

1. Akute Vergiftung.

Fünf Tiere erhielten im Laufe von 24 (einmal 48) Stunden mehrfache subkutane Injektionen von Calciumchlorid in Gesamtdosen zwischen 0,3 und 1,2 g des wasserhaltigen Salzes je Kilogramm (vgl. Tabelle XIII). Zwei von ihnen (Nr. 12 und 15) waren tödlich vergiftet und starben etwa zwei Stunden nach der letzten Injektion. Zwei andere hatten mindestens drei Viertel der tödlichen Dosis erhalten und nur eines (Nr. 14) etwa die Hälfte davon. Bei Nr. 17 wurde überdies durch Prüfung der Reaktion je einer Augenbindehaut auf Einträufelung von Senföl vor und nach der Calciumzufuhr die Existenz einer starken Calciumwirkung kurz vor dem Tode festgestellt. Es lagen also Bedingungen vor, die das Maximum an Calciumzufuhr darstellen, das experimentell erreichbar ist, Bedingungen, die weit über das hinausgehen, was therapeutisch jemals in Frage kommt.

a) Muskeln.

Die erhaltenen Zahlen finden sich auf Tabelle 14 verzeichnet. Ihre Auswertung ist zunächst *statistisch* möglich, wenn man sie mit den Normalwerten der Tabelle VIII zusammenhält. Man sieht, daß bei dreien der fünf Tiere die Werte von 8,3; 8,5 und 10,2 mg-Proz. durchaus

Tabelle XIII.
Akut vergiftete Calciumtiere, Muskeln.

Versuchsnummer	Körpergewicht kg	g (Ca Cl ₂ + 6H ₂ O) je kg		Dosenzahl	Zeitpunkt der ersten Dosis Stunden v. d. Tode		Todesart	Art des Muskels	Zur Analyse entnommen		Gef. mg ^{0/10} CaO
		insgesamt	Einzel-						g	Minuten n. dem Tode	
12	3,0	1,20	0,6	2	19 ^{1/2}	21 ^{1/2}	†	r. Quadriceps	19,57	27	8,3
13	2,5							r. Adduktoren	18,48	24	8,3
14	2,4	0,60	0,3	2	19 ^{1/2}	18	verblutet		7,46	45	21,4
15	2,5	0,30 0,66	0,1 0,22	3 3	48 24 ^{1/4}	5 21 ^{1/4}	verblutet †	l. Quadriceps	8,80	36	10,2
								l. Quadriceps + Adduktoren	15,07	30	12,3
								Beuger des l. Oberschenkels	15,42	37	9,8
								l. Unterschenkel	14,35	50	11,8
16	2,8	0,51	0,10—0,21	4	23	2	verblutet	l. Quadriceps	17,20	30	8,8
								l. Adduktoren	20,68	37	6,5
								l. Wade	17,45	50	8,5
								l. Beuger des Oberschenkels	19,74	46	10,3

denen entsprechen, die relativ häufig bei Normaltieren auftreten; auch ein vierter Wert von 11,3 (Nr. 17) weicht kaum von dem Mittel der Normalwerte (10,6) ab und nur der fünfte liegt mit 21,4 wesentlich höher, aber immer noch niedriger als der höchste Normalwert. Das Ergebnis ist also negativ: eine Steigerung des Muskelkalks durch die Kalkzufuhr ist aus den Zahlen nicht zu erkennen.

Dies wird bestätigt durch die Versuche 15 und 16, bei denen durch aseptische Operation die rechten Oberschenkel der Tiere amputiert worden waren.

Die Operation wurde in dem Operationssaal für Tiere der chirurgischen Universitätsklinik zu Göttingen durch Herrn Dr. Walter Lehmann ausgeführt, dem wir dafür aufrichtigen Dank schulden; wir machten dabei die Erfahrung, daß das Durchsägen des Femurknochens einen außerordentlich heftigen Schock setzt, dem tief narkotisierte Tiere regelmäßig erliegen; nur in leichtester Narkose wird er ertragen.

Beide Tiere erholten sich binnen weniger Tage von dem Eingriff; die Wunden heilten per primam, obwohl bei der Sektion sterile Hämatome neben dem Amputationsstumpf des Knochens gefunden wurden. Die Temperatur stieg bei Nr. 16 am

Abend des der Operation folgenden Tages bis 39,1, sonst bewegte sie sich bei beiden Tieren in normalen Grenzen (37,6 bis 38,4). Die Freßlust war vom zweiten Tage an vorzüglich, nach 5 Tagen sprangen die Tiere mit ihren drei Beinen von Tischen zur Erde usw. Nr. 15 kam 6, Nr. 16 7 Tage nach der Amputation zu Tode (vgl. S. 277/278).

Der Vergleich der Muskeln des amputierten Beines mit denen des anderen ist natürlich nicht dem Vergleich zweier Extremitäten eines getöteten Tieres gleichzustellen, wie er in Versuch 1 durchgeführt wurde (vgl. Tabelle VII); denn es ist ja eine nicht ganz gerechtfertigte Voraussetzung, daß die im Verbands des lebenden Tieres verbleibenden Muskeln ihren Kalkgehalt unverändert so festhalten, wie er im Augenblick der Amputation bestand. Immerhin darf man hoffen, daß unbekannte „konstitutionelle“ Einflüsse bei einem Vergleich am gleichen Individuum ausgeschaltet werden. Auf Tabelle XIV sind die Zahlen der parallelen Muskeln nochmals gegenübergestellt.

Tabelle XIV.

Muskeln der gleichen Tiere vor und nach Calciumvergiftung.

Versuchsnummer	Art des Muskels	Rechts (vor Ca) mg-% Ca O	Links (nach Ca) mg-% Ca O
15	Quadriceps + Adduktoren	8,5	12,3
	Beuger des Oberschenkels	9,6	9,8
	Unterschenkel	9,5	11,8
16	Quadriceps	8,3	8,8
	Adduktoren	7,1	6,5
	Wade	12,0	8,5

In dreien von den sechs Parallelanalysen ist die Übereinstimmung so vollkommen, wie man sie sich nur wünschen kann. Auch die Differenz bei der Unterschenkelmuskulatur von 15 fällt mit 22 % Abweichung noch recht nahe an den Streubereich der methodischen Fehler. In zwei Fällen (Quadriceps 15 und Wade 16) sind die Abweichungen allerdings größer und zufällig fast genau gleich, doch in *entgegengesetztem* Sinne! Für die Beweisführung heben sie sich also gegenseitig auf. Es ergibt sich demnach, fast noch zwingender als aus der obigen statistischen Betrachtung der Schluß, daß Calciuminjektionen auch bei hoher Dosierung den Calciumgehalt der Muskeln *nicht* verändern.

b) Leber.

Aus den Zahlen der Tabelle XV folgt (im Vergleich zu Tabelle IX): Bei vier calciumvergifteten Tieren, und zwar auch bei einem nach der Vergiftung *getöteten*, liegen die Werte vollkommen in dem Bereich des Normalen. Sogar der Mittelwert der drei sicheren Zahlen (Nr. 13, 15, 16) stimmt mit dem Mittelwert der Normaltiere vollkommen überein: 11 mg-Proz. Ca O.

Nur bei Nr. 12 ist der Kalkwert der Leber entschieden *erhöht* (dabei in verschiedenen Abschnitten der Leber verschieden stark). Jedoch kann dieser Befund nicht als korrekt angesehen werden: denn das Tier war 2½ Stunden nach Injektion der enormen Dosis von 18 ccm einer 5proz. Lösung wasserhaltigen Calciumchlorids gestorben, und bei der Sektion zeigte sich wasserhelle Flüssigkeit nicht nur zwischen Bauchhaut und Bauchmuskeln, sondern auch in der Bauchhöhle. Das Netz war mit den Därmen leicht verklebt, die Darmoberfläche unregelmäßig gerötet, das Mesenterium mit zahlreichen kleinen Blutungen besetzt. Es war also Calciumchlorid versehentlich ins Peritoneum injiziert worden und von dort offenbar unmittelbar in das Lebergewebe diffundiert und von dessen Lymphbahnen resorbiert worden.

Tabelle XV.

Akut vergiftete Calciumtiere, Leber und Gehirn.

Versuchsnummer	Leber			Gehirn			
	Zur Analyse entnommen		Gefunden mg-% CaO		Zur Analyse entnommen		Gefunden mg-% CaO
	g	Minuten vor dem Tode			g	Minuten vor dem Tode	
12	14,50	45	(37,8)	l. Hälfte . .	14,64	34	11,4
	19,38	47	(21,5)	r. " . .	13,04	36	18,6
13	10,94	133	12,8	—	10,88	172	18,8
14	12,49	57	> 9,6	—	10,91	105	17,4
15	19,45	> 1000	11,3	l. Hälfte . .	11,56	> 1000	14,6
	17,50	> 1000	11,2	r. " . .	13,05	> 1000	12,7
	16,23	> 1000	14,7				
16	18,13	75	7,3	l. Hälfte . .	14,80	86	10,8
	18,31	76	8,3	r. " . .	15,55	90	10,0
	18,33	78	8,7				

Auch für die Leber bestätigt sich also das Ergebnis, daß Calciumzufuhr ihren Kalkgehalt *nicht* beeinflusst.

c) Gehirn

Die Beurteilung stößt hier aus dem oben erörterten Grunde — Gefahr der Beimischung von Knochensplittchen — auf besondere Schwierigkeiten. Läßt man als einwandfrei nur diejenigen Zahlen gelten, die in guter Übereinstimmung *doppelt* belegt sind, so muß man sich auf einen Vergleich der Normaltiere 1, 2 und 3 mit den Calciumtieren 15 und 16 beschränken: Er zeigt, daß ein Calciumtier genau den gleichen Hirnkalk aufweist wie ein Normaltier, nämlich 10½ mg-Proz. CaO. Von dieser Zahl weichen die beiden anderen Normaltiere um 30 und 45 % nach unten ab, das zweite Calciumtier um 30 % nach oben. Es wäre mindestens kühn, aus diesem Tatbestande eine Steigerung des normalen Kalkgehaltes durch Kalkvergiftung zu folgern. Aber selbst wenn man eine solche zugeben

würde, so bleibt weit sicherer die Tatsache bestehen, daß eine wenig geringere, eben noch ertragbare Dosis (0,51 g des wasserhaltigen Salzes je Kilogramm im Laufe eines Tages (Versuch 16) *keine* Erhöhung des Hirnkalks über den Normalbereich bedingt hat; für therapeutische Dosen läßt sie sich bestimmt ausschließen.

Pharmakologisches Interesse hat allerdings die Frage, ob bei einer höheren (tödlichen) Dosis der Hirnkalk erhöht wird oder nicht; denn erst in *gefährlichen* Dosen kann man — wenigstens bei subkutaner Zufuhr — zentrale Symptome hervorrufen. Ob in unserem Falle 15 das Auftreten solcher Wirkungen mit der Erhöhung des Hirnkalks über 10½ auf 13½ mg-Proz. CaO zusammenhängen mag, muß noch offen bleiben.

Läßt man alle Werte gelten, so lehrt die statistische Betrachtung, daß die Calciumwerte eine *geringere* Streuung um das *gleiche* Mittel (15 mg-Proz. CaO) aufweisen als die Normaltiere. Genau dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man unsere früheren Befunde an normalen und intravenös behandelten Tieren hinzurechnet oder für sich betrachtet ¹⁾.

Mithin kann auch diese Betrachtungsweise als Beweismittel dafür dienen, daß mindestens so lange, als keine zentralen Vergiftungssymptome auftreten, der Kalkgehalt des Gehirns durch Calciumdosen *nicht* verändert wird.

d) Nieren.

Die Zahlen der Tabelle XVI weisen einen weitgehenden Parallelismus zwischen dem Kalkgehalt des Nierengewebes und der zugeführten Kalkmenge auf. Bei den beiden an der Vergiftung gestorbenen

Tabelle XVI.

Akut vergiftete Calciumtiere, Nieren.

Versuchsnummer	Zurichtung des Organs	Zur Analyse abgewogen		Gefunden mg ^{0/10} CaO	Zugeführt je kg Gesamtdosis CaO mg
		g	Minuten n. dem Tode		
12	r. Niere, Rinde zum Teil abgeschält	7,68	19	30,0	307
	l. Niere, Mark möglichst vollständig ausgeschält	9,62	21	33,8	
13	nur Rindensubstanz . . .	9,69	157	16,6	153
14	nur Rinde	11,44	69	7,0	77
15	ganze linke Niere	10,21	> 1000	26,9	169
	ganze rechte Niere . . .	10,36	1000	22,1	
16	ganze linke Niere	11,27	83	12,3	130
	ganze rechte Niere . . .	11,17	84	13,1	

¹⁾ Vgl. diese Zeitschr. 93, 357.

Tieren (12 und 15) ist er deutlich höher als der höchste Normalwert (Tabelle X). (Zwar ist im Versuch 12 die intraperitoneale Injektion in Rechnung zu setzen, doch dürfte sie an den tiefliegenden, gut verkapselten Nieren weit weniger zu einer unmittelbaren Imbibition geführt haben als bei Leber und Därmen.)

Entsprechend der bekannten Tatsache, daß das Calcium zum Teil durch die Nieren ausgeschieden wird, findet sich also bei Überladung des Körpers mit Kalk eine Erhöhung des Nierenkalks.

e) Darm.

Von den auf Tabelle XVII verzeichneten Zahlen müssen die vom Versuch 12 gestrichen werden, weil hier intraperitoneale Injektion und unmittelbare Imprägnation der Darmwand mit Calciumchloridlösung erfolgt war. Die übrigen Werte — als Mittelzahlen von jedem Tier betrachtet — liefern im Vergleich zur Norm (Tabelle XI) keinen scharfen Beleg für eine Änderung infolge der Kalkbehandlung.

Tabelle XVII.

Akut vergiftete Calciumtiere, Darm.

Versuchsnummer	Teil und Zurichtung des Organs	Zur Analyse abgewogen		Gefunden mg-% Ca O
		g	Minuten n. dem Tode	
12	Erstes Stück, beginnend 20 cm unterhalb der Papilla Vateri	11,92	11	(63,4)
	Zweites Stück, daran anschließend	14,52	14	(96,0)
14	Dünndarm, beginnend 30 cm oberhalb Ileocoeraklappe, oralwärts, leer	9,65	75	25,9
	Zweites Stück Dünndarm, beginnend 5 cm oberhalb des vorigen, abgebunden, mit Inhalt	8,29	77	14,5
	Enddarm, Mittelstück, leer	5,51		48,8
15	Dünndarm, vom Ende des Duodenums an vier aufeinander folgende Stücke abgetrennt, die zusammen etwa zwei Drittel des ganzen Dünndarms ausmachen	I 15,29 II 16,28 III 15,10 IV 13,74	> 1000 > 1000 > 1000 > 1000	19,4 17,2 19,5 22,7
16	Dünndarm, oberstes Stück des Duodenums	16,51	55	13,2
	Dünndarm, nächstfolgendes Stück, etwa 25 cm lang	15,57	58	17,6
	Enddarm	10,63	69	47,1

Zwar liegt das Mittel für den Dünndarm der drei Tiere mit $18\frac{1}{2}$ ein wenig höher als das Mittel der drei Normaltiere von 16,8 mg-Proz. CaO; nimmt man aber nur eine der Normalzahlen fort, so bleiben

drei fast gleiche Wertepaare übrig (Versuch 2 und 14; 3 und 15; 9 und 16). Auch für den Enddarm liegen die beiden Zahlen bei Calciumvergiftung mit 48,8 und 47,1 mg-Proz. CaO kaum höher als der einzige Normalwert von 44,3; übrigens sind alle drei merklich höher als die früher von uns ermittelten, die sich zwischen 25 und 39 mg-Proz. bewegten und damals sogar bei den kalkbehandelten Tieren *niedriger* lagen als bei den unbehandelten.

Das Mittel von vier Bestimmungen am Enddarm lag damals bei 31 mg-Proz., jetzt von drei Analysen bei 47. Vielleicht hängt dieser beträchtliche Unterschied mit der Ernährung zusammen, insofern die früher benutzten Tiere kalkarme Fleischkost, die jetzigen gemischte Nahrung erhielten. Man würde dann zu dem Ergebnis gelangen, daß der Nahrungskalk wichtiger für den Kalkgehalt des Darmes ist als die reichliche Zufuhr von Kalksalzlösungen.

Denn mindestens *ungewiß* ist es, ob eine Änderung des Darmkalks durch die Injektionen erfolgt; wenn ja, so ist sie ziemlich geringfügig. Im Versuch 15 kann man berechnen, daß in zwei Dritteln des gesamten Dünndarms sich nur 4 mg CaO mehr befanden als bei Annahme des niedrigsten Normalwertes; dabei hatte das Tier $2\frac{1}{4}$ Stunden vor dem Tode 140 mg CaO erhalten, nachdem es bereits vorher mit Calcium überladen worden war.

f) Sonstige Organe (vgl. Tabelle XVIII.)

Als normale Grenzen für die *Lungen* waren oben die Werte von 24 und 35 mg-Proz. CaO bezeichnet worden (vgl. S. 261); die beiden untersuchten Calciumtiere fügen sich dem gleichen Bereich ein. Dasselbe gilt für das *Herz*.

Tabelle XVIII.

Akut vergiftete Calciumtiere, sonstige Organe.

Versuchsnummer	Organ	Zur Analyse abgewogen		Gefunden mg. $\frac{1}{100}$ CaO
		g	Minuten n. dem Tode	
12	Lunge, mit zahlreichen weißen Flecken besetzt	16,68	62	33,4
14	Lunge von normalem Aussehen	5,17	92	22,4
13	Herz	8,84	163	12,4
14	Herz	10,80	84	11,0
12	Milz	6,40	53	(50,6)
13	Haut, am lebenden Tier vor der Calciuminjektion enthaart	6,79	25	36,1
14		5,96	30	34,0

Der auffällig hohe Wert für die *Milz* im Versuch 12 erklärt sich wiederum durch Imbibition infolge intraperitonealer Injektion, kann also nicht gezählt werden.

Zwei Analysen der *Haut* von Calciumtieren weisen einen relativ hohen Gehalt dieses Organs auf. Leider fehlen brauchbare Kontrollanalysen an hinreichend großen Stücken Haut von normalen Tieren.

2. Chronische Vergiftung.

Nach den Ergebnissen des vorigen Hauptabschnitts war die Aussicht nicht sehr groß, Änderungen im Kalkgehalt der wichtigsten Organe festzustellen, wenn eine wiederholte Zufuhr während längerer Zeit, natürlich *kleinerer*, sicher ertragbarer Dosen erfolgte. Dennoch wurden einige Versuche dieser Art durchgeführt, um den Bedingungen therapeutischer Kalkzufuhr, z. B. auch in Form kalkhaltiger Mineralwässer näherzukommen. Die Pausen zwischen Ende der Calciuminjektion und Analyse wurden von einem bis zu mehreren Tagen variiert. Die Konzentration der eingespritzten Lösungen betrug 1 oder 2 % des wasserhaltigen Salzes. Weitere zahlenmäßige Angaben finden sich kurz auf den Tabellen XIX und XX zusammengestellt.

Tabelle XIX.

Chronisch vergiftete Calciumtiere, Muskeln.

Versuchsnummer	Körpergewicht kg	g (CaCl ₂ + 6 H ₂ O) je kg		Zeitpunkt der ersten / letzten Dosis Tage vor dem Tode		Zur Analyse entnommen		Gef. mg. ^{3/10} CaO
		insgesamt	Einzeldosen			g	Minuten n. dem Tode	
17	1,9—2,3	0,70	0,10	10	1	8,42	30	16,9
18	1,7—2,2	0,83	0,075	14	1	11,06	30	7,4
19	2,1—2,4	0,70	0,05—0,075	55	6	11,8	?	9,6
20	2,6—3,1	0,63	0,05—0,075	52	10	10,5	?	12,3

Erwähnung verdient zunächst der *regelmäßige* Befund, daß die Tiere im Laufe der ersten Woche der Kalkbehandlung erheblich *an Gewicht zunehmen*. Der Zuwachs betrug stets 0,3 kg oder mehr, also rund das Zehnfache der im gleichen Zeitraum injizierten Flüssigkeitsmengen, und war auch dann festzustellen, wenn zwischen der letzten Injektion und der Wägung mehrere Tage verstrichen waren. Später stellte sich bei fortgesetzten Injektionen das Gewicht konstant ein oder ging sogar auf den Ausgangswert zurück (Versuche 19 und 20). Die Kurventafel gibt einen Überblick über dies Verhalten. Der Befund scheint uns sehr interessant und weiterer Verfolgung wert; nach unseren bisherigen, rein zufälligen Beobachtungen können wir keinerlei Deutungsversuche wagen.

Die Calciumzahlen müssen im Vergleich zu den früheren Werten (der Tabellen VII bis XVIII) betrachtet werden. Erleichtert wird dieser Vergleich durch die Generaltabelle XXI, auf der wir nur die uns einwandfrei erscheinenden Werte aufgenommen haben. Es zeigt sich,

Generaltabelle XXI
für Milligramme CaO in 100 g frischer Organe.

Organ	Zahl d. analysierten Tiere			Variationen			Mittel		
	normal	Calcium akut	Calcium chronisch	normal	Calcium akut	Calcium chronisch	normal	Calcium akut	Calcium chronisch
Muskel . . .	9	5	4	5—27	8—21	7—17	10,7	11,9	11,8
Leber . . .	9	3	4	6—15	8—12	13—27	11,2	11,1	16,5
Gehirn . . .	9	6	4	6—24	10—19	9—19	14,6	15,0	13,4
Niere . . .	8	5	3	7—18	7—32	7—18	9,5	18,5	14,1
Dünndarm . .	4	3	—	11—24	13—26	—	16,8	18,4	—
Enddarm . .	3	4	2	32—44	25—49	28—37	38,4	37,0	32,6
Lungen . . .	5	4	—	16—32	17—35	—	24,9	26,9	—
Herz	4	2	3	11—16	11—12	13—27	13,6	11,7	20,0

die Normalzahlen für den Muskelkalk stimmen (Tabelle VIII, S. 257), unter denen nur zwei die übrigen zehn, zwischen 5 und 12 verstreuten Beträge in weitem Abstand überragen: 18 und 27. Man wird dabei auch wohl in anderen Geweben, wie z. B. der Leber, prinzipiell mit vereinzelt Sprüngen des Kalkwertes über das normale Maß hinaus rechnen müssen; die Annahme unbemerkter kleiner pathologischer Herde mit Verkalkungen würde die Möglichkeit eines Verständnisses für diese relativ seltenen und auffälligen Befunde liefern. Unter diesem Gesichtspunkt tut man wohl gut, es in der Schwebe zu lassen, ob der hohe Wert in der Leber des Versuchs 17 *zufällig* oder durch die Kalkbehandlung *verursacht* war.

Ähnliche Überlegungen sind natürlich auch bei der Betrachtung der Zahlen für das *Herz* anzustellen. Hier sieht man in *zwei* der drei untersuchten Fälle chronischer Kalkzufuhr eine wesentliche Steigerung über alle sonst gefundenen Werte hinaus. Freilich ist die statistische Betrachtung hier noch mißlicher als bei manchen anderen Organen, weil die Gesamtzahl der untersuchten Fälle kleiner ist; infolgedessen ist natürlich auch die Wahrscheinlichkeit geringer, daß ein solcher aus der Reihe fallender *höherer* Wert unter den Normalzahlen auftritt. Ferner ist auch hier wieder zu betonen, daß eine *Gesetzmäßigkeit nicht* zu erkennen ist: denn der dritte chronisch behandelte Fall (Nr. 19) weist einen völlig normalen Wert auf, obwohl die Art der Vorbehandlung nicht wesentlich von dem Versuch 20 abwich, der einen hohen Wert lieferte — übrigens nicht weniger als *10 Tage nach Aussetzen* der Kalkbehandlung. Bei dem Tier Nr. 17 trifft der erhöhte Wert im *Herzen* mit dem gleichen Befund in der *Leber* zusammen, was natürlich als ein Argument gegen ihre Zufälligkeit verwertet werden kann. Trotz aller Vorbehalte ist die Möglichkeit ja nicht bestimmt auszuschließen, daß wenigstens in diesem Falle ein Zusammenhang zwischen chronischer Kalkzufuhr und Steige-

rung des Organkalks in Leber und Herzen besteht. Zur endgültigen Aufklärung müßte die Zahl solcher Versuche noch vergrößert werden, damit ein statistisches Vergleichsverfahren möglich wird.

C. Calcium und Stickstoff.

Als eine Ergänzung zu der Ermittlung der Calciumwerte, bezogen auf das *Frischgewicht* der Organe, mag es dienen, wenn sie auf den *Stickstoffgehalt* der Organe bezogen werden, der in einigen unserer Versuche gleichzeitig bestimmt wurde (vgl. oben S. 252). Man kann denken, daß diese Zahlen die Calciumkonzentration im Verhältnis zu den wichtigsten Bestandteilen des Protoplasmas der Organzellen zum Ausdruck bringen, unabhängig von „Zufälligkeiten“, wie Fett, Zwischenzellflüssigkeit u. dgl. Sie finden sich auf Tabelle XXII zusammengestellt. Man sieht, daß der wesentliche Charakter der bisher besprochenen Ergebnisse nicht geändert wird: Bei Muskel und Leber finden sich schon in der Norm Schwankungen bis zum *Dreifachen* des Minimalwertes; Gehirn und Lunge weisen in den hier untersuchten Fällen etwas stabilere Verhältnisse auf. Doch lehrt ein Blick auf die früheren Tabellen (IX, XII, XV, XVIII, XX), daß dies zufällig ist, insofern dieselben Tiere, bei denen der Stickstoffgehalt bestimmt wurde, auch im Verhältnis zum Organgewicht ziemlich ähnliche Zahlen ergeben, was aber durchaus nicht für *alle* Individuen zutrifft.

Tabelle XXII.

Calciumwerte, bezogen auf Stickstoff (CaO in Prozenten des N).

Versuchsnummer	Vorbehandlung	Muskel	Leber	Gehirn	Niere	Lunge	Herz	Haut
5	keine	0,82	0,33	1,24	0,50	—	—	—
6	"	0,63	0,87	1,05	—	0,83	—	—
7	"	0,27	0,33	1,30	—	—	—	—
8	"	0,34	0,55	1,13	0,75	—	—	—
13	Calcium akut . .	0,81	0,33	0,94	—	—	—	0,91
14	Calcium akut . .	0,38	> 0,33	0,93	0,43	1,06	—	0,88
17	Calcium chronisch	0,57	0,91	1,02	0,69	—	0,86	—

Für die *Minimalwerte* findet sich bei Muskel und Leber für das Verhältnis CaO : N auffallend häufig die Zahl von 0,3⁰/₀; man wird schließen dürfen, daß sie eine *gesetzmäßige* Verknüpfung zum Ausdruck bringt, nämlich das für den Ablauf der Lebensvorgänge *notwendige* Mischungsverhältnis. Es ist lehrreich, den Calciumgehalt des Blutserums in dem gleichen Maßstab auszudrücken: man kommt dann zu etwa 1,4⁰/₀, d. h. auf gleiche Eiweißmengen ist der Calciumgehalt sehr erheblich größer. Bei keinem der vorliegenden Gewebs-

analysen wird dieses Verhältnis überschritten, in einem Fall bei Gehirn (Nr. 7) nahezu erreicht.

Nicht ohne Interesse ist in diesem Zusammenhang das Ergebnis der Untersuchung der *Lunge* im Versuch 5. Sie war durch Ödem etwa auf das Doppelte ihres Normalgewichts vergrößert, ihr Gehalt an Kalk betrug 17,5 mg-Proz., an Stickstoff 1,99 %, deren Verhältnis also 0,88 %. Ödemmenge und Stickstoffgehalt der ödematösen Lunge entspricht etwa einer Mischung von normalem Lungengewebe und Blutserum; der Calciumgehalt dagegen, sowohl in bezug auf das Organgewicht wie in bezug auf den Stickstoff, ist *niedriger*, als man danach erwarten müßte. Gewiß ist diese Berechnung nicht ganz unbedenklich, dennoch mag sie wenigstens Veranlassung zu der *Frage* geben, ob das Calcium der Blutflüssigkeit ebenso leicht durch die Kapillarwand dringt, wie die Hauptmenge der stickstoffhaltigen Substanzen.

D. Analyse eines Kaninchens.

Anhangsweise mag ein vereinzelter Befund am Kaninchen mitgeteilt werden, weil die Zahlen prinzipiell das gleiche ergeben wie bei der Katze, nämlich einen ziemlich niedrigen Kalkgehalt in Muskeln und Leber bei ziemlich kräftiger Calciumzufuhr. Dies ist merkwürdig im Vergleich zu den *histologischen* Befunden über Kalkablagerungen in den Geweben des Pflanzenfressers nach Injektion von Calciumsalzen, wie sie von *Tanaka*¹⁾ und *Katase*²⁾ — allerdings nach etwas längerer Zwischenzeit — erhoben wurden. Leider fehlen uns bislang Kontrollanalysen von normalen Kaninchen.

Das Tier erhielt im Verlauf von 3 Stunden in drei Injektionen insgesamt 1,35 g ($\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$) als 5proz. Lösung subkutan; nach weiteren $2\frac{1}{2}$ Stunden erzeugte Einträufelung von Senföl ins Auge *keine* Chemosis (Vorlesungsdemonstration). 4 Stunden nach der letzten, also 7 Stunden nach der ersten Injektion wurde das Tier entblutet; Blut, Muskeln und Leber der Analyse zugeführt. Die erhaltenen Zahlen gibt Tabelle XXIII.

Tabelle XXIII.
Calciumkaninchen.

Organ	Zur Analyse ab- gewogen		Gefunden mg./% Ca O	Mittel
	g	Minuten n. dem Tode		
Blut	10	—	17,7	—
Muskel, linker Quadriceps	17,71	13	10,1	10,3
„ Beuger des linken Oberschenkels	16,05	20	10,8	
„ Beuger d. rechten Oberschenkels	16,33	28	10,2	
Linker Rückenmuskel	14,31	32	10,0	
Leber, wiegt im ganzen 98,4 g	20,57	40	9,5	7,2
„	22,22	45	7,2	
„	20,48	50	5,2	
„	24,69	55	7,0	

¹⁾ Diese Zeitschr. 85, 113, 1911.

²⁾ Zieglers Beitr. 57, 516, 1913.

V. Erörterung der Ergebnisse.

Das Hauptergebnis der geschilderten Untersuchungen läßt sich in zwei Sätzen zusammenfassen:

1. *Der Calciumgehalt der Organe wechselt schon in der Norm sehr stark.*

2. *Nach Calciumbehandlung ist — abgesehen von der Niere — keine irgendwie faßbare Veränderung zu konstatieren.*

Der Inhalt beider Sätze ist auffallend und unerwartet:

Zu 1. Wir sind gewohnt, nicht nur in der Blutflüssigkeit, sondern auch in den festen Geweben im allgemeinen ziemlich enge Grenzen für die Variationen der Kationenbildner zu finden. So schwankt z. B. Kalium im Muskel sogar in der ganzen Klasse der Säugetiere nur von 0,32 bis 0,43 ‰, Magnesium von 21 bis 30 mg-Proz.¹⁾ Von Variationen *um das Mehrfache* bei derselben Gewebsart der gleichen Tierart ist nicht im entferntesten die Rede. Man muß daraus wohl schließen, daß Calcium in den meisten Geweben in einer biologisch inaktiven Form irgendwie gespeichert werden kann, und daß man daher mindestens in allen Werten, die *oberhalb* des Minimums gelegen sind, *zwei* Arten von Calcium gemeinsam umfaßt: den biologisch aktiven, mit den übrigen Kationen gleichzustellenden Anteil und den gespeicherten Anteil. Dabei mag fürs erste die Frage unerledigt bleiben, wie weit man solche Befunde von „gespeichertem“ Calcium bei gesunden Tieren schon zum Gebiet des Pathologischen rechnen darf (verkalkte Reste früherer Entzündungsherdchen, Parasiten oder ähnliches?).

Aus der notwendig zu ziehenden Schlußfolgerung ergibt sich ohne weiteres die Berechtigung, ja Nötigung zu weitgehender Skepsis gegenüber der Beweiskraft von Calciumbefunden in Organen, deren Zahl zu einer wenigstens angenähert *statistischen* Bewertung nicht ausreicht. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint uns z. B. das in unserer früheren Arbeit noch zitierte Zahlenmaterial über Hirnkalk von *Weigert*²⁾ zu klein, von *Mc Callum* und *Voegtlin* mindestens knapp³⁾.

Zu 2. Die in unseren Versuchen einverleibten Calciummengen erreichten nicht nur die tödliche Grenze, sondern damit auch eine absolute Höhe, daß ihr Einfluß auf den Kalkgehalt der Organe unbedingt erwartet werden durfte. In einem unserer Fälle (Nr. 15) wurden sowohl 2 1/4 wie 5 1/4 Stunden vor dem Tode je Kilogramm

¹⁾ Vgl. die Zusammenstellung in einheitlicher Berechnung bei *W. Heubner*, Mineralstoffwechsel: Handbuch der Balneologie usw. von *Dietrich-Kaminer* 2, 201, 1922.

²⁾ Monatsschr. f. Kinderheilk. 5, 457, 1906; vgl. diese Zeitschr. 98, 360.

³⁾ Journ. of exper. Med. 11, 118, 142f., 1909; vgl. ebenda.

56 (also zusammen 112) mg CaO subkutan verabreicht, nachdem schon tags zuvor die gleiche Dosis gegeben worden war. Wir haben festgelegt, daß bei solchen Dosen im *Blute* nach etwa 2 Stunden das Maximum des Calciumanstiegs erreicht ist, das binnen wenigen Stunden wieder absinkt; will man selbst annehmen, daß von der letzten Dosis noch nicht alles resorbiert war, so wird dies kompensiert durch die drei Stunden früher gegebene, gleich große. Die Ausscheidung binnen 5 Stunden können wir nicht sehr hoch einschätzen; zwar wurde sie im Versuch 15 nicht bestimmt, doch haben wir bei einem anderen ebenso schwer vergifteten Calciumtier (Nr. 13) wenigstens den Harn von der ersten Injektion an gesammelt und auf Calcium analysiert: es fanden sich in 21 ccm Harn (von 20 Stunden) nur 6,3 mg CaO, obwohl das Tier 350 mg subkutan, und zwar alles bis zur 18. Stunde vor dem Tode erhalten hatte. Man sollte also bei solchen Tieren wohl erwarten, daß in den Hauptorganen eine Vermehrung des Kalks um 5 bis 10 mg-Proz. leicht nachweisbar sei, wenn nämlich das einverleibte Material sich *gleichmäßig* im ganzen Körper verteilen würde. Wenn, wie es der Fall ist, die Muskulatur als Hauptmasse des Körpers *keine* solche Vermehrung erkennen läßt, so müßte in kleineren Einzelorganen der Anstieg noch viel gewaltiger sein; doch ist davon erst recht keine Rede. Kurz, es deutet alles darauf hin, daß ein merklicher Anteil des injizierten Calciums im Körper *verschwindet*, d. h. in Form von *Knochensalzen* abgelagert wird. Aus Stoffwechselanalysen ist die Erscheinung der Kalkspeicherung im Knochengewebe längst bekannt; neu ist in unserem Versuche nur die *Geschwindigkeit* dieses Vorganges.

Wir sind uns wohl bewußt, daß diese Vorstellung, zu der unsere Ergebnisse uns drängen, noch nicht so zwingend bewiesen ist, wie es erwünscht wäre. Vor allem muß natürlich die Ausscheidung durch den Darm berücksichtigt werden, wenn wir ihr auch a priori nicht die Riesenleistung zutrauen, die wir ihr ohne Annahme einer Ablagerung im Knochen zuschreiben müßten. Unsere Versuche waren von vornherein nicht auf dies Endergebnis eingestellt, sonst wären die Ausscheidungen gründlicher berücksichtigt worden. Dies muß in neuen Versuchen nachgeholt werden.

Eine dunkle Frage bleibt es zunächst, warum die offensichtliche Fähigkeit der weichen Gewebe zur Aufspeicherung von Calcium aus der Nahrung so wenig in Anspruch genommen wird bei der subkutanen Einverleibung größerer Mengen von Calciumsalz. Die Lösung dieser Frage dürfte nicht leicht sein, solange man mit Zufallsprodukten bei der Aufstellung von „Normalzahlen“ zu rechnen hat; sie zu vermeiden, wird vielleicht nur in sehr kostspieligen Versuchsreihen mit langdauernder Fütterung junger Tiere vom gleichen Wurf gelingen.

Zusammenfassung.

1. An einer größeren Zahl von Katzen wurden Normen für die Gewichte und den Stickstoffgehalt der wichtigsten Organe aufgestellt.

2. Die früheren Feststellungen über den Kalkgehalt des Katzenblutes in der Norm und nach Kalkinjektionen wurden bestätigt, diejenigen über den Kalkgehalt des Serums revidiert.

3. Der Kalkgehalt der Organe normaler Katzen erwies sich als wechselnd in beträchtlichem Ausmaß. Die *Minimalwerte* für CaO liegen bei Muskel, Leber, Gehirn und Niere zwischen 5 und 7 mg-Proz. des Frischgewichts, bei Herz und Dünndarm um 11, bei der Lunge um 16, beim Enddarm zwischen 25 und 30 mg. In der Milz lag der geringere Wert von zwei Analysen bei 10 mg.

4. Bei akuter, schwerer Calciumvergiftung findet sich *ausschließlich in der Niere* ein sicher nachweisbarer Anstieg des Organkalks, *sonst nirgends*. Auch der Vergleich von Muskeln desselben Tieres vor und nach Calciumvergiftung ergibt keinen Unterschied.

5. Die Haut von zwei calciumvergifteten Tieren enthielt 34 und 36 mg-Proz. CaO; von normalen Tieren wurden einwandfreie Analysen nicht ausgeführt.

6. Vermutlich wird ein erheblicher Anteil des subkutan zugeführten Calciums sehr rasch in den Knochen abgelagert.

7. Es gibt pharmakologische Wirkungen des Calciums, die ebenso wenig von einer Anreicherung des Calciums in einem Organe, wie von einem Anstieg des Blutwertes begleitet sind.

8. Bei wiederholter subkutaner Calciumzufuhr während längerer Zeit scheint der Organkalk gleichfalls unverändert zu bleiben, wenn auch Hinweise auf die Möglichkeit einer Anreicherung in Herz und Leber nicht ganz fehlen.

9. Das Körpergewicht scheint in der ersten Woche chronischer Calciumzufuhr regelmäßig zuzunehmen.

Anhang.

I. Auszug aus den Protokollen.

Versuch 4. Weibliche Katze, seit längerer Zeit im Institut mit Küchenabfällen gefüttert († 26. Juni 1919).

Versuch 5. Desgleichen; Bauchhaut vor dem Entbluten mit Strontiumsulfid enthaart († 9. Oktober 1919).

Versuch 6. Weiblich, seit 3 Monaten im Institut; frisst die letzte Woche vor dem Tode schlecht und magert ab († 22. September 1919).

Versuch 7. Weiblich, Haut des linken Beines mit Strontiumsulfid behandelt († 26. September 1919).

Versuch 12. Sehr wilder Kater, seit 4 Wochen im Institut mit Küchenabfällen gefüttert; erhält am 10. Mai 1920 6 Uhr 45 Min. nachmittags subkutan 18 ccm 5proz. Lösung von $(\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O})$ (Analyse ergab 4,95 %); nach $\frac{1}{4}$ Stunde gewaltiges Erbrechen. 11. Mai 11 Uhr 45 Min. vormittags Tier sehr still und gedrückt, erhält die gleiche Injektion; 1 Uhr 15 Min. Apathie, sonst nichts Abnormes; 3 Uhr nachmittags Tier totenstarr gefunden; 3 Uhr 12 Min. Temperatur im After 31°C .

Versuch 13. Weibliches Tier, seit 1 Jahr im Institut gefüttert; 14. Januar 1920 Gewicht 2,85 kg, mit Strontiumsulfid enthaart; am nächsten Tage frißt das Tier nicht und ist etwas matt; 16. Januar frißt es *wenig* vorgehaltenes Futter, wiegt 2,25 kg; erhält subkutan 3 Uhr nachmittags 13,5 ccm 10proz. Lösung von $(\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O})$ (Analyse 9,5 %) — ohne sichtliche Wirkung; 4 Uhr 30 Min. nochmals die gleiche Injektion; 5 Uhr 40 Min. leichtes Taumeln beim Laufen, 6 Uhr 50 Min. nur etwas Apathie. Während der Nacht mehrmaliger Absatz von breiigem Kot; 17. Januar deutlich krank, auffallend still. — Bei der Sektion unter der Rückenhaut starke und ausgebreitete Hyperämie und blutig-sulziges Ödem um die (vier) deutlich erkennbaren Injektionsstellen herum.

Versuch 14. Weiblich, seit 1 Woche im Institut, wiegt 2,2 kg; 5. November 1919 abends Bauchhaut mit Strontiumsulfid behandelt; 6. November 1919 sehr still, frißt nicht, obwohl enthaarte Haut überall von ganz normaler Beschaffenheit; mittags Milch gierig gesoffen, abends fester Kot. 5 Uhr 15 Min. nachmittags mit 11 ccm 4proz. Lösung von $(\text{CaCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O})$ injiziert (Gewicht 2,4 kg); 7. November 12 Uhr 15 Min. Gewicht 2,6 kg; nochmals gleiche Dosis; 12 Uhr 30 Min. Fütterung; 5 Uhr 20 Min. entblutet, erbricht dabei reichlich Flüssigkeit. Um die Injektionsstellen gallertiges Ödem.

Versuch 15. 11. Februar 1920, 9 Uhr 15 Min. bis 9 Uhr 45 Min. vormittags in Äthernarkose rechter Oberschenkel amputiert; 16. Februar, 10 Uhr 25 Min. vormittags zwei Tropfen Senföl ins rechte Auge, nach 10 Min. bereits starke Chemosis, auch von außen Schwellung der Lider erkennbar; 11 bis 7 Uhr nachmittags Chemosis *maximal*; 7 Uhr subkutane Injektion von 7,5 ccm 5proz. Chlorkalciumlösung. 17. Februar, 1 Uhr mittags Chemosis noch hochgradig, 8 ccm der gleichen Lösung; 4 Uhr tiefe, dyspnoische Atmung, Herzschlag sehr langsam (Schmerzen?), Augenspalz 4 mm; Wiederholung der letzten Injektion; 5 Uhr 45 Min. dauernd tiefe Atmung, 25 in der Minute, Puls 96; Chemosis stark zurückgegangen doch noch deutlich; 5 Uhr 55 Min. großer Tropfen Senföl ins linke Auge; 6 Uhr 3 Min. bei Berührung des Auges heftige Reaktion des Tieres, doch keine Chemosis; 6 Uhr 4 Min. beginnen krampfartige Zuckungen und Seitenlage; 6 Uhr 5 Min. stirbt das Tier trotz künstlicher Atmung; 6 Uhr 12 Min. Temperatur in der Bauchhöhle $33,5^\circ$. — Bei der Sektion eröffnet sich am amputierten Bein ein etwa pflaumengroßer, gut abgekapselter Abszeß zwischen Knochenstumpf, Bauchdecken und Haut; in ihm liegt ein weißgelber Fetzen (Fascie?).

Versuch 16. Weibliche Katze, seit 3 Wochen im Institut mit gemischter Kost gefüttert, Gewicht 2,8 kg. 10. März 1921 in Äthernarkose rechter Oberschenkel amputiert. 16. März sehr munter, wiegt 2,4 kg; mittags letzte Fütterung; 3 Uhr 55 Min. zwei Tropfen Senföl ins rechte Auge, Schwellung beginnt sofort; 5 Uhr vollkommener Verschuß der Lidspalte; 7 Uhr dasselbe, Injektion von 10 ccm einer 5proz. Chlorkalciumlösung.

12 Uhr nachts Chemosis schwach, Augenspalte voll zu öffnen, Hornhaut getrübt. 17. März, 9 Uhr vormittags, 5 ccm der gleichen Lösung; 12 Uhr 10 Min. dasselbe, 4 Uhr 5 Min. nochmals dasselbe: Tier munter, springt mit seinen drei Beinen vom Tisch in den Käfig; 4 Uhr 50 Min. zwei Tropfen Senföl ins linke Auge; 5 Uhr Rötung und beginnende Schwellung der Bindehaut, 5 Uhr 40 Min. mäßige Schwellung, 5 Uhr 55 Min. noch etwas stärkere Chemosis, doch viel geringer als tags zuvor, Lidspalte noch bis zu 4 mm zu öffnen. 6 Uhr 10 Min. Tier entblutet. — Sektion: Um Knochenstumpf dunkelrote, flüssige, geruchlose Masse abgekapselt; Injektionsstellen nicht auffindbar, also keine stärkere entzündliche Reaktion. Darm völlig leer.

II. Gewichte der Katzen und ihrer Organe.

(Zeit der Wägung stets: Minuten nach Tötung des Tieres.)

Normaltiere.

Nummer	1	2	3	4	5	6	7
Körpergewicht kg. . .	2,50	3,07	2,74	1,94	2,50	1,42	1,90
Leber g	65,55	92,70	77,26	62,69	63,42	28,66	43,77
Zeit der Wägung . . .	95	268	270	217	87	82	73
Gehirn g	25,96	28,54	28,81	28,59	25,90	23,91	—
Zeit der Wägung . . .	99	235	350	295	89	35	—
Nieren g	—	28,00	—	12,24	18,11	8,31	11,33
Zeit der Wägung . . .	—	299	—	248	118	95	86
Lungen g	—	—	29,15	16,24	—	12,05	11,46
Zeit der Wägung . . .	—	—	334	270	—	126	114
Herz g	—	—	—	7,73	—	5,34	8,70
Zeit der Wägung . . .	—	—	—	266	—	114	101
Milz g	—	9,97	—	3,36	3,87	0,98	2,82
Zeit der Wägung . . .	—	294	—	239	90	85	65

Calciumtiere.

Nummer	12	13	14	15	16	17	18
Körpergewicht kg. . .	3,00	2,85	2,20	2,50	2,80	2,25	2,12
Leber g	79,06	74,91	65,20	68,50	74,17	75,25	65,79
Zeit der Wägung . . .	ca. 110	125	49	ca. 650	73	68	65
Gehirn g	27,68	24,44	25,25	24,98	30,35	—	23,65
Zeit der Wägung . . .	ca. 100	172	97	ca. 2000	86	—	133
Nieren g	—	—	14,48	—	22,44	16,92	18,03
Zeit der Wägung . . .	—	—	52	—	84	85	90
Lungen g	16,68	11,75	16,15	—	—	17,91	15,22
Zeit der Wägung . . .	ca. 125	160	87	—	—	128	125
Herz g	—	9,55	10,80	—	—	9,47	8,97
Zeit der Wägung . . .	—	163	83	—	—	118	111
Milz g	6,40	3,42	2,18	—	—	3,26	3,42
Zeit der Wägung . . .	ca. 120	102	81	—	—	77	81

III. Analytische Belege.

1. Stickstoff.

Versuchs- nummer	Organ	Abgewogen		Verbraucht n HCl ccm
		g	nach Minuten	
5	Muskel	1,86	57	4,28
	Leber	2,87	107	6,71
	Gehirn	2,66	102	3,26
	Nierenrinde	1,02	122	1,82
	Lunge	1,80	147	2,56
	Haut	1,16	44	2,46
	(Haut, verschorft d. Sr S)	1,92	40	4,23
	Haare	1,17	35	11,08
6	Muskel	1,13	30	2,28
	Leber	3,44	84	4,36
	Gehirn	3,27	38	4,46
	Niere	1,07	99	2,08
	Lunge	0,50	129	1,08
	Herz	0,66	117	1,34
	Haut	0,47	18	1,29
	Haare	0,87	0	8,28
7	Muskel	5,65	35	13,31
	Leber	4,12	85	9,98
	Gehirn	5,05	61	6,46
	Niere	1,60	89	3,11
	Lunge	2,73	119	5,72
	Herz	1,09	114	2,12
	Haut	0,28	21	0,79
	Haare	0,57	10	5,28
8	Muskel	1,65	25	4,30
	Leber	1,20	84	2,27
	Gehirn	1,61	55	2,23
	Niere	2,07	90	3,52
	Herz	0,78	116	1,70
	Milz	0,68	62	1,45
	Fell	1,25	18	6,36
	—	—	—	—
13	Muskel	3,64	57	9,20
	Leber	1,85	136	5,10
	Gehirn	3,18	177	4,55
	Dünndarm	1,95	89	4,00
	Enddarm	1,38	84	2,72
	Lunge	0,70	164	1,40
	Haut	2,43	24	6,85
	—	—	—	—
14	Muskel	2,98	44	5,66
	Leber	2,18	53	4,55
	Gehirn	1,58	102	2,11
	Nierenrinde	1,06	64	1,23
	Lunge	1,47	95	2,22
	Haut	1,10	38	3,03
	Haare	0,59	—	5,62
	—	—	—	—
17	Muskel	1,45	29	3,08
	Leber	2,85	72	5,99
	Gehirn	1,50	112	2,04
	Niere	2,43	89	4,60
	Herz	1,21	121	2,58
	Milz	0,83	80	1,75
	Haut	2,10	21	5,45
	—	—	—	—

Nr.	Lunge		Nr.	Herz		Nr.	Blut	
3	12,25	7,77	13	8,84	3,90	1	10	3,76
	13,26	6,44	14	10,80	4,25	2	10	3,37
4	7,84	7,30	17	8,26	7,59		15	6,28
5	6,44	6,17	19	6,8	3,07	5	10	4,27
6	4,48	4,00	20	6,5	5,02	7	10	3,81
9	9,95	11,50		Milz		14	10	4,30
12	16,68	19,87				17	10	4,09
14	5,17	4,14	2	9,97	3,37	19	10	3,51
	Herz		9	5,33	2,57		10	3,56
4	7,27	3,68	12	6,40	11,57	20	10	4,44
5	11,85	4,73		Haut				4,32
8	6,95	4,05	13	6,79	8,75	Kn	10	6,31
9	11,15	5,00	14	5,96	7,23			

Die Salzhydrolyse der Stärke. I.

Von

W. Biedermann.

(Aus dem physiologischen Institut zu Jena.)

(Eingegangen am 13. November 1922.)

Eine Arbeit, die ich vor kurzem in den Archives Néerlandaises de Physiologie, tome VII, 1922, p. 151, veröffentlicht habe, trägt den Titel: „Die diastatische Wirkung von Albumosen und Aminosäuren“. Ich habe nun zwar im Texte ausdrücklich betont, daß diese Wirkung nicht den Albumosen oder Aminosäuren *an und für sich* zukommt, sondern daß der Erfolg in beiden Fällen an das Vorhandensein von gewissen Salzen (Ionen) und vor allem auch von Sauerstoff geknüpft erscheint; dennoch sind meine Angaben, wie mir bekannt wurde, mehrfach mißverstanden und so aufgefaßt worden, als ob ich behauptet hätte, daß jene organischen Stoffe *für sich allein* nach Art diastatischer Fermente wirkten. Dies ist nun aber keineswegs der Fall, vielmehr liegen hier die Dinge genau so, wie bei dem Speichelferment, wo ja auch die organische Komponente des Komplexes von Stoffen, an den wir die diastatische Wirkung jeweils gebunden sehen, ohne Salzionen und Sauerstoff völlig wirkungslos bleibt. Dennoch hat man sich gewöhnt, hier wie in anderen Fällen von Fermentwirkungen gerade kolloidale organische Stoffe als die eigentlichen Träger derselben zu betrachten und diese in fast allen Fällen noch unbekannten Substanzen demgemäß ohne weiteres mit den betreffenden Fermenten identifiziert. Wenn sich dann herausstellte, daß in manchen Fällen das Wirksamwerden eines Fermentes ganz unverkennbar an das Hinzutreten gewisser anderer Stoffe geknüpft erscheint, so hat man diesen doch nur eine mehr untergeordnete Rolle als Aktivatoren oder Kofermente zuerkannt, das „Zymogen“ war und blieb das Wesentliche, das eigentlich Aktive. Durch Erfahrungen der letzten Zeit, die den Gegenstand dieser Mitteilung bilden, bin ich zweifelhaft geworden, ob sich dieser Standpunkt in bezug auf diastatische Fermente länger festhalten läßt. Jedenfalls erscheint es dringend

notwendig, den Stoffen, welche die organische Komponente eines Ferments überhaupt erst zu einem wirksamen Bestandteil eines Systems mit fermentativen Eigenschaften machen, eine größere Aufmerksamkeit zuzuwenden, als es bisher der Fall gewesen ist. Dies gilt in erster Linie von den *Salzen*, bezüglich deren Einwirkung auf verschiedene Fermente in der Literatur zwar ein sehr großes Material aufgespeichert ist, doch gewinnt man beim Studium desselben sehr bald die Überzeugung, daß hier fast alles noch zu tun bleibt. Ebenso ist die wenigstens für Amylasen ausschlaggebende Bedeutung des *Sauerstoffs* bisher so gut wie gar nicht berücksichtigt worden. Von Ionenwirkungen haben eigentlich nur die H- und OH-Ionen eingehende Würdigung gefunden, und es erregte fast Befremden, als sich herausstellte, daß die Speicheldiastase nicht nur von H-Ionen, sondern auch von vielen anderen Ionenarten in ihrer Wirkung selbst in minimalen Konzentrationen maßgebend beeinflusst wird. Ich konnte zeigen, daß dies für alle Diastasen Geltung hat, und durch Untersuchungen von *Haehn* sind wir darüber unterrichtet, daß es sich bei der Tyrosinase ganz ähnlich verhält. Aber nicht nur, daß die Ionen gewisser Salze für das Zustandekommen der eben genannten Fermentwirkungen absolut unerläßlich sind, es schien sogar zunächst, daß die Ionen der Chloride, Bromide und namentlich die neutraler Phosphatmischungen *für sich allein* schon genügen, um Stärke hydrolytisch zu spalten.

Ich muß hier auf Versuche zurückkommen, die ich schon vor Jahren anstellte und dann als „*Autolyse*“ der Stärke deutete. Es handelt sich um die Tatsache, daß Stärke unter dem Einfluß von Salzgemischen, wie sie in der Speichelasche gegeben sind, oder auch nur von einer einfachen Kochsalzlösung bei einer Temperatur von etwa 40° früher oder später vollständig bis zu Zucker abgebaut wird. Meine ersten Angaben hierüber stießen — wohl hauptsächlich wegen ihrer Unvereinbarkeit mit den herrschenden Vorstellungen — mehrfach auf Widerspruch; man glaubte die Hydrolyse auf Bakterienwirkungen beziehen zu können, zumal sich die Dauer solcher Versuche oft über viele Stunden erstreckte. Da außerdem eine solche Stärke-Salzmischung, wenn sie durch Aufkochen sterilisiert und vor weiterem Luftzutritt geschützt wurde, auch nach Tagen noch unverändert blieb, so schien es in der Tat so, als ob ich mich hätte täuschen lassen. Es kam dazu, daß, wie ich selbst mehrfach hervorgehoben hatte, möglichst gleichartig hergestellte Proben unter ganz gleichen Bedingungen, doch hinsichtlich der bis zum Verschwinden der Jodreaktion erforderlichen Zeitdauer oft große Verschiedenheiten darboten, Schwierigkeiten, die ich lange nicht beherrschen lernte. Alles das war, wie ich zugeben muß, wenig geeignet, meinen Arbeiten

Anerkennung zu verschaffen. Jetzt, nachdem es mir gelungen ist, in dem Einfluß des Sauerstoffs auf den Spaltungsprozeß den Grund aller jener Unregelmäßigkeiten und auch die Ursache für die Stabilität steriler (gekochter) Proben klarzustellen, kann von einer Täuschung meinerseits nicht mehr die Rede sein, und mit der „Salzhydrolyse“, die sich nun auch in unmittelbar vor Beginn des Versuches gekochten, sterilen Lösungen schon innerhalb einer Vorlesungsstunde nachweisen läßt, muß als einer feststehenden Tatsache gerechnet werden. Anders liegen die Dinge bezüglich der *Deutung* der Erscheinung. Die nächstliegende Frage war offenbar die, ob es sich gegebenenfalls um eine *direkte* oder um eine *indirekte* Wirkung handelt: sind es die Salze (Ionen) an und für sich, welche die Stärke chemisch beeinflussen oder geschieht dies auf dem Umwege eines Fermentes, welches dann entweder aus dem Substrat neu gebildet werden oder diesem als solches anhaften müßte? Ich hatte mich zunächst für die erstere Annahme entschieden, und zwar hauptsächlich auf Grund der Tatsache, daß die Stärke-Salzgemische offensichtlich an Wirksamkeit zunehmen, wenn der Stärke-(Amylose-)Zusatz mehrfach wiederholt wird, und zweitens geht die neugewonnene diastatische Kraft sofort verloren, wenn eine solche Lösung auch nur kurze Zeit gekocht wird. Dieses letztere Verhalten erklärt sich nun freilich sehr einfach durch das Austreiben des Sauerstoffs bzw. der Luft aus der Flüssigkeit. Dagegen schien die ersterwähnte Tatsache sehr entschieden zugunsten der Annahme einer indirekten, durch ein Ferment vermittelten Wirkung zu sprechen. Nachdem sich dann aber herausgestellt hatte, daß die organische Komponente des Speichelfermentes und, wie es scheint, aller Diastasen ein albumosenartiges Proteid ist, erschien die an sich ja recht unwahrscheinliche Annahme einer Neuentstehung von Ferment aus Stärke nicht länger haltbar, und es blieb nur noch die zweite Möglichkeit, die „Autolyse“ auf vorgebildete, den Körnern anhaftende und als Fermentreste auch in die bei 80° bereiteten Amyloselösungen übergehende Diastase zu beziehen, wenn man nicht eine direkte Salzwirkung annehmen wollte. Eine solche Auffassung schien um so eher berechtigt, als ja eine weitgehende Thermostabilität der Diastasen mit Sicherheit festgestellt werden konnte. Auch war für mich der Umstand ganz wesentlich mitbestimmend, daß kalt bereitete, durch Zerreiben von Rohstärke mit Wasser hergestellte Extrakte verhältnismäßig stark diastatisch wirken.

Gleichwohl bin ich jetzt zu der Überzeugung gelangt, daß es sich bei dem von mir als Autolyse gedeuteten Vorgang in Wirklichkeit doch um eine *direkte* Salzwirkung, um eine „Salzhydrolyse“ handelt. Die Gründe, welche mich zu dieser Änderung meiner bisherigen Auffassung veranlassen, sind, wie ich glaube, zwingender Art.

Es kann keinem Zweifel unterworfen sein, daß der organische Bestandteil diastatischer Fermente durch länger dauernde Einwirkung starker Säuren zerstört wird. Es wäre also anzunehmen, daß Amyloselösungen durch geeignete Behandlung mit Säuren von den hypothetischen Fermentspuren oder Resten befreit werden könnten, ohne im übrigen chemisch tiefergreifende Veränderungen zu erleiden. Schon A. Meyer gibt an, daß es durch Behandlung von Rohstärke mit starken Mineralsäuren gelingt, Amyloselösungen herzustellen: „HCl und H_2SO_4 wirken, wenn sie eine genügende Konzentration besitzen, schon bei gewöhnlicher Temperatur kräftig lösend auf α - und β -Amylose, doch geht zugleich Hand in Hand mit der Lösung Umwandlung eines Teiles der Stärkesubstanzen in Amylodextrin, Dextrin und Zucker“. Behandelt man trockene Stärke mit 36 % Salzsäure, indem man das Becherglas in eine Kältemischung von Eis und Kochsalz stellt, so quillt die Stärke unter Verkleisterung stark auf und wird bei anhaltendem Rühren in verhältnismäßig kurzer Zeit völlig gelöst. Diese Lösung wird mit dem zwei- bis dreifachen Volumen Wasser verdünnt, filtriert, was sehr leicht und klar vor sich geht, und dann mit dem dreifachen Volumen Alkohol unter starkem Rühren gefällt. Die Amylose wird auf dem Filter anhaltend mit Alkohol gewaschen, dem zuletzt eine Spur Ammoniak zugesetzt wird; ist die saure Reaktion vollständig geschwunden, wird das Präparat unter Alkohol aufbewahrt. Nach dieser von Bütschli¹⁾ gegebenen Vorschrift hatte ich mir schon vor Jahren aus Kartoffelstärke Amylose hergestellt, die sich nach Absaugen des Alkohols noch feucht in kaltem Wasser außerordentlich leicht und vollkommen klar löste. Dabei zerstiëbt die Masse sofort in lauter kleine Stückchen, die sich fast momentan lösen. Mit Jod geprüft, gibt eine solche Lösung rein blaue Färbung. Läßt man die Einwirkung der Säure aber zu lange dauern, so erhält man Präparate von wesentlich anderen Eigenschaften, indem sich einerseits dem Blau bei Jodzusatz immer mehr Rot beimischt, während andererseits auch die Fällbarkeit durch Alkohol Veränderungen erfährt (vgl. Fermentforschung II, 1919, S. 465). Zu den Versuchen eignen sich selbstverständlich nur solche Präparate, welche auf Grund der rein blauen Jodfarbe als aus reiner Amylose bestehend gelten durften. Mit solchen Lösungen erhielt ich schon damals bei Zusatz von Speichelasche oder auch von NaCl allein positive Ergebnisse, die mich in der Ablehnung von Fermentresten und in der Annahme einer Neuentstehung von Diastase aus dem Substrat wesentlich bestärkten. Bei Versuchen mit Diastasen verwendet man vielfach Präparate von sogenannter

¹⁾ O. Bütschli, Über Amylose und amyloseartige Körper. Verh. d. Naturhist.-Med. Vereins zu Heidelberg. N. F. VII. 1903.

löslicher Stärke, die durch verschiedene chemische Vorbehandlung, besonders auch mit Säuren, dargestellt werden und beim Erhitzen mit Wasser vollkommen klare Lösungen geben, die nun freilich nicht reine Amylozelösungen darstellen, da sie sich bei Jodzusatz nicht rein blau, sondern stets schon mehr oder weniger violett färben. Auch hier war zu erwarten, daß Fermentspuren, welche den Stärkekörnern etwa ursprünglich anhafteten, zerstört oder wenigstens erheblich geschädigt sein müßten. Endlich habe ich Amylozelösungen, die in gewöhnlicher Weise durch Erhitzen auf nur 80° hergestellt waren, nachher noch stundenlang unter Ersatz des verdunsteten Wassers gekocht und ihre Fähigkeit zu „autolytischer“ Spaltung mit eben solchen nicht gekochten Lösungen verglichen. In allen diesen Fällen ließ sich nun bei dem jetzt geübten Verfahren im Gegensatz zu den älteren Autolyseversuchen ein irgend erheblicher Unterschied der Reaktionszeiten nicht feststellen, wenn nur die Konzentration der Amylozelösungen annähernd die gleiche war und außerdem als wesentlichste Bedingung die Proben gleichlang mit Luft geschüttelt waren. Ja, es erwiesen sich reine, nach dem *Bütschlichen* Säureverfahren hergestellte Amylozelösungen sogar besser geeignet, als alle übrigen, eine Tatsache, die an sich schon mit der Theorie der Fermentspuren kaum in Einklang zu bringen sein dürfte.

Bei den meiner letzten Arbeit zugrunde liegenden Versuchen mit Lösungen von Albumosen und Aminosäuren hatte ich diesen einfach etwas NaCl in Substanz zugesetzt und dann nach Vermischen mit dem gleichen Volumen gekochter Amylozelösung mit Luft geschüttelt. Als Kontrollprobe diente eine Mischung der gleichen Menge derselben Amylozelösung mit ebensoviel 0,5 proz. NaCl-Lösung. Während diese dann bei 40° stundenlang unverändert blaue Jodreaktion gab, trat unter dem Einfluß der Albumosen oder Aminosäuren verhältnismäßig rascher Abbau der Amylose ein. Steht man nun auf dem Standpunkt, daß es eine „Autolyse“ in dem bisher von mir angenommenen Sinne gibt, so läßt sich offenbar schwer darüber eine sichere Entscheidung treffen, ob die beobachteten Wirkungen nicht einfach als eine stark beschleunigte Autolyse aufzufassen sind. Das lange Unverändertbleiben der Kontrollproben im Verein mit der Tatsache, daß Amylozelösungen, welche, um die hypothetischen Fermentreste zu zerstören, mit Natronlauge versetzt und nach mehrstündiger Einwirkung wieder (mit HCl) neutralisiert worden waren, von sauerstoff- und kochsalzhaltiger Albumosenlösung ganz ebenso abgebaut wurden, wie normale, schien mir die Annahme einer autolytischen Spaltung auszuschließen. Ich hielt mich daher für berechtigt, anzunehmen, „daß jene Eiweiß-Spaltprodukte an sich nach Art eines diastatischen Ferments wirken und Amylose hydrolytisch abzubauen imstande

sind“. Dieser nicht ganz korrekte Satz war es wohl auch, der zu dem Mißverständnis Anlaß gab, ich hätte ausdrücken wollen, daß Albumosen und Aminosäuren für sich allein (*ohne Salze und Sauerstoff*) diastatisch wirken könnten.

Ich war damals noch der Überzeugung, daß dies ebensowenig möglich ist, wie daß Salze allein, ohne Mitwirkung von präexistenten Diastasespuren instande sind, Stärke hydrolytisch zu spalten. Da nun aber die Richtigkeit dieser letzteren Annahme seither äußerst zweifelhaft geworden ist, so schien es mir unerlässlich, die Autolyseversuche einer nochmaligen Überprüfung zu unterziehen. Eine solche hat mich nun auch in den Stand gesetzt, den Versuchen jetzt eine Form zu geben, in der sie von jedermann leicht und mit absolut sicherem, raschem Erfolg angestellt werden können, ohne daß an eine Mitwirkung von Bakterien auch nur im entferntesten gedacht werden könnte.

1 g Kartoffelstärke wird mit 100 ccm destilliertem Wasser im Wasserbad auf 80° erhitzt und dann sofort in einem sterilisierten Glaszylinder mit Toluol überschichtet. Nach dem Absetzen wird ein Teil der vollkommen klaren Lösung mit einer sterilen Pipette abgehoben und mit etwa dem 1½fachen Volumen destilliertem Wasser verdünnt, da es für einen raschen Verlauf des Versuches durchaus notwendig ist, daß die in einer Probe enthaltene Stärkemenge nicht zu groß ist, ein Umstand, auf den ich früher nicht immer genügend geachtet hatte. Ein Tropfen einer solchen Lösung soll auf einer weißen Unterlage mit Jodjodkaliumlösung eine vollkommen rein blaue Färbung ohne jede Spur von Violett geben. Nun vermische man im Reagenzglas etwa 5 ccm der Amyloselösung mit dem gleichen Volumen einer frisch bereiteten Phosphatmischung (0,3 g NaH_2PO_4 , 0,8 g Na_2HPO_4 und 0,5 g NaCl auf 100 ccm Wasser) und schüttele nach Aufkochen und Abkühlen der Probe 15 Minuten lang kräftig mit Luft (Probe a). Eine zweite Probe (b) wird in ganz gleicher Weise hergestellt, aber nicht mit Luft geschüttelt. Endlich dient zum Vergleich noch eine dritte Probe (c), in der an Stelle der Phosphatmischung destilliertes Wasser tritt; diese wird wieder wie (a) 15 Minuten lang mit Luft geschüttelt. Alle drei werden hierauf in ein Wasserbad von 40 bis 45° eingestellt. Es ist bemerkenswert, daß die Jodreaktion schon unmittelbar nach dem Schütteln einen Unterschied zwischen (a) und den beiden anderen Proben erkennen läßt, indem die Farbe von (a) ganz deutlich violett getönt ist, während (b) und (c) noch rein blau erscheinen. Dem entspricht nun, daß (a) sehr bald rotviolette, dann rote Jodreaktion gibt und schließlich achromisch wird. Durchschnittlich dauert es unter den angegebenen Bedingungen etwa 3 Stunden, bis dieser Punkt erreicht

ist. Dann reagiert aber (b) im günstigsten Falle erst blau mit einem schwachen Stich ins Violett und (c) noch rein blau. Man kann den Vorgang der Hydrolyse noch etwas beschleunigen, wenn man (a) während der Erwärmung noch einigemal kurz mit Luft schüttelt. Ist der achromische Punkt erreicht, so läßt sich in jedem solchen Fall Zucker mit Sicherheit nachweisen. Wählt man bei gleicher Versuchsanordnung als Ausgangsmaterial ein nach *Bütschlis* Methode dargestelltes Amylosepräparat in einer Konzentration, die, soweit sich dies nach der Tropfenfarbe bei Jodzusatz beurteilen läßt, annähernd der einer normalen Amyloselösung entspricht, so beobachtet man ausnahmslos einen wesentlich rascheren Abbau, so daß die erste Schüttelprobe meist schon nach 2 Stunden den achromischen Punkt erreicht hat. Auch *Kahlbaums* lösliche Stärke verhält sich ganz ähnlich, empfiehlt sich aber wegen der von vornherein schon blau-violetten Jodfarbe weniger. Da nun auch Amyloselösungen, die in der gewöhnlichen Weise durch Erhitzen auf 80° gewonnen, dann aber mit NaOH-Lauge stark alkalisch gemacht und nach mehreren Stunden wieder neutralisiert worden waren, unter der Einwirkung von Phosphatmischungen der angegebenen Zusammensetzung kein anderes Verhalten zeigten, wenn die Proben nur wieder anhaltend mit Luft geschüttelt wurden, so glaube ich, daß die Annahme, es handle sich bei der reinen Salzhydrolyse um das Wirksamwerden von Resten der organischen Komponente eines diastatischen, den Stärkekörnern anhaftenden und auch in den Lösungen noch in Spuren vorhandenen Ferments, aufgegeben werden muß. Dann bleibt aber keine andere Möglichkeit der Erklärung, als die Annahme, daß die „Autolyse“ nichts anderes ist, als eine durch die Ionen gewisser Salze im Verein mit Sauerstoff direkt bewirkte langsame Hydrolyse.

Ob die angegebenen Versuchsbedingungen, auf deren strenge Einhaltung bei Wiederholung der Versuche zu achten ist, nun wirklich schon die möglichst günstigen sind, will ich keineswegs behaupten, halte es sogar für wahrscheinlich, daß die Zusammensetzung der Phosphatmischungen sich noch ganz wesentlich wird verbessern lassen. Wie ich schon in meinen ersten Arbeiten angegeben habe, sind auch reine Kochsalzlösungen (0,5 bis 2 %) wirksam, aber freilich sehr viel schwächer. Welche Rolle bei der Salzhydrolyse der Sauerstoff spielt, ist vorläufig noch ganz unklar, daß sie aber eine maßgebende ist, geht aus den beschriebenen Versuchen unmittelbar hervor. Es kommt offenbar ganz wesentlich darauf an, daß die einzelnen Flüssigkeitsteilchen während längerer Zeit immer wieder mit Luft in direkte Berührung gebracht werden, wie es beim Schütteln eben der Fall ist. Beim bloßen Vermischen von Amylose- und Salzlösung, die beide dauernd mit Luft in Berührung, also auch lufthaltig sind,

kommt es zwar schließlich auch zu einer Hydrolyse, aber doch erst so verzögert, daß solchen Versuchen immer eine gewisse Unsicherheit anhaftet, die sie, wie meine bisherigen Erfahrungen ja genügend zeigen, verdächtig erscheinen lassen. Alle die mannigfachen Unregelmäßigkeiten, die mir früher so viel zu schaffen machten, lassen sich nun leicht verstehen und daher auch vermeiden. Es war daran zu denken, ob nicht vielleicht das Schütteln an und für sich schon eine Hydrolyse einleitet oder befördert, dies ist aber, wie die angeführten Versuche zeigen, nicht der Fall. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu prüfen, welchen Einfluß die Konzentration der Salze, die Temperatur, Reaktion, das Alter der Amylozelösung und andere Umstände auf den Vorgang der Salzhydrolyse ausüben. Hier kommt es mir nur darauf an, meine bisherigen Angaben zu ergänzen und, soweit es erforderlich ist, richtigzustellen. Dies gilt vor allem auch von der Beobachtung, die mich in allererster Linie dazu bestimmte, die „Autolyse“ nicht einfach für eine direkte Salzwirkung zu halten, sondern für einen durch Diastasespuren vermittelten Vorgang. Es betrifft dies die Tatsache, daß Salz-Amylosegemische an Wirksamkeit zunehmen, wenn der Amylosezusatz mehrfach wiederholt wird. Ich hatte dabei nicht berücksichtigt, daß sich dann die gleiche Amylosemenge auf ein immer größeres Flüssigkeitsvolumen verteilt, die Konzentration also dementsprechend immer mehr abnimmt. Da aber, wie schon erwähnt wurde, die Menge von Stärkesubstanz in einer Probe für die Schnelligkeit der Umsetzung von größter Bedeutung ist und diese natürlich im umgekehrten Verhältnis zur Konzentration steht, so erklärt sich sehr einfach, daß mit jedem neuen Zusatz die Reaktionszeit abnimmt. Es kann also auch dieser Umstand nicht länger als ein Grund für die Annahme einer „Autolyse“ gelten.

Sieht man nun aber eine *direkte* Salzhydrolyse für bewiesen an, dann steht man vor der überraschenden Tatsache, daß von *allen Komponenten eines Systems, wie es in einem diastatischen Ferment gegeben erscheint, nur allein die anorganischen Salze, bzw. deren Ionen imstande sind, im Verein mit Sauerstoff Stärke hydrolytisch vollständig bis zu Zucker abzubauen, während die organische Komponente, die nach den herrschenden Anschauungen das eigentlich Wesentliche einer Amylase ausmacht, dies nicht zu leisten vermag und dazu nur durch das Hinzutreten von Salzen und Sauerstoff befähigt wird.* Man fühlt sich beinahe versucht, die bisherige Ausdrucksweise geradezu umzukehren und der organischen Grundsubstanz eines diastatischen Ferments die Rolle eines Kofermments oder Komplements zuzuschreiben, die bisher den anorganischen Salzen zuerkannt wurde.

Diese Tatsache verliert nicht an Bedeutung dadurch, daß die Intensität der reinen Salzwirkungen im Vergleich mit der geradezu explosiven Spaltung durch eine typische Amylase, wie etwa Speicheldiastase, auch unter den günstigsten Bedingungen immer außerordentlich viel geringer ist, vielmehr gewinnt gerade dadurch das Studium der Einflüsse, durch die jene schwachen Wirkungen so enorm gesteigert werden, noch erhöhtes Interesse.

Daß schon eine passende Ionen-Mischung sehr viel energischer wirkt, als einfache Salzlösungen, geht unmittelbar aus meinen früheren Erfahrungen und aus den hier mitgeteilten Versuchen hervor. Ungleich leistungsfähiger erweisen sich aber noch Zusätze gewisser organischer Substanzen. Sehr auffallend fördernd wirken schon *Aminosäuren*, wie beispielsweise Glykokoll.

Man stelle mit einer Amyloselösung, wie sie auch zu den früheren Versuchen gedient hatte, folgende vier Proben her:

a) 5 ccm Amylose + 5 ccm frisch mit destilliertem Wasser bereiteter 1 proz. NaCl-Lösung werden im Reagenzglas aufgeköcht und abgekühlt.

b) Die gleiche Mischung mit einem Zusatz von 0,05 g Glykokoll, ebenfalls gekocht und abgekühlt.

c) Gleiche Volumina Amyloselösung und frisch bereitete Phosphatmischung derselben Zusammensetzung wie früher.

d) Wie (c), nur mit Zusatz von 0,05 g Glykokoll.

Alle vier Proben werden $\frac{1}{4}$ Stunde lang kräftig mit Luft geschüttelt und dann bei 40° gehalten. Schon unmittelbar nach dem Schütteln reagieren (b) und (d) mit Jod im Vergleich zu (a) und (c) deutlich violettstichig. Nach 2 Stunden gibt (a) noch blauviolette, (b) gelbrötliche, (c) rotviolette und (d) rein gelbe Jodreaktion. Löst man die gleiche Menge Glykokoll in möglichst reinem destillierten Wasser statt in einer Salzlösung, so ist, auch wenn man ebenso lange mit Luft schüttelt, eine solche Mischung nicht imstande, Hydrolyse der Amylose herbeizuführen. Zwar macht sich nach vielen Stunden dann meist eine leichte Veränderung der rein blauen Jodfarbe nach dem Violett hin bemerkbar, aber man wird dies wohl auf den unvermeidlichen Salzgehalt der Amyloselösung selbst beziehen müssen, wie ja auch die diastatische Wirkung eines kalt bereiteten, wässerigen Stärkeextrakts darauf beruhen dürfte.

Die Beschleunigung der Hydrolyse durch Aminosäuren (wie *Glykokoll* verhalten sich auch *Alanin* oder *Leucin*) ist, wie man in jedem solchen Versuch immer wieder feststellt, eine außerordentlich auffallende. Sie tritt noch deutlicher hervor, wenn statt der Phosphatmischung einfache Kochsalzlösung benutzt wird. In diesem Falle dauert es viele Stunden, ehe eine Probe ohne Aminosäure den achro-

mischen Punkt erreicht hat, auch wenn sie vorher mit Luft geschüttelt wurde, und man wird leicht zu der irrtümlichen Ansicht verführt, daß reine Salzlösungen überhaupt nicht fähig sind, Hydrolyse der Stärke zu bewirken. Wenn dies nun auch nicht zutrifft, so bleibt doch die große Überlegenheit geeigneter Mischungen von NaCl und Phosphaten eine sehr bemerkenswerte Tatsache. Es verhält sich hier ähnlich, wie mit der fördernden Wirkung einzelner Aminosäuren im Vergleich zu Gemischen von solchen. In wirksamster Form verschafft man sich solche durch anhaltende Trypsinverdauung von Fibrin bis zum Eintritt des abiureten Stadiums. 4 bis 5 g Rohfibrin werden unter Zusatz von Thymol in etwa 150 ccm alkalischem Wasser mit Trypsin (*Grübler*) bei 40° verdaut, bis die Lösung abiuret geworden ist. Dann wird mit HCl neutralisiert, gekocht und filtriert. Die fast farblose Lösung wird nun auf etwa 50 ccm eingeeengt, 3 ccm derselben werden hierauf mit ebensoviel 1 proz. NaCl-Lösung verdünnt, nach Zusatz des gleichen Volumens Amylozelösung aufgeköcht und dann nach raschem Abkühlen 15 Minuten mit Luft kräftig geschüttelt. Zum Vergleich dient eine ebenfalls aufgeköchte und mit Luft geschüttelte Probe von gleichen Teilen Amylose und 1 proz. NaCl-Lösung. Beide Proben werden bei 40° gehalten. Unter dem Einfluß der Verdauungsflüssigkeit erfolgt in diesem Falle die Hydrolyse so schnell, daß der achromische Punkt meist schon nach 1 Stunde erreicht wird. Fast ebenso günstig wirken *Albumosengemische*, wie sie durch Pepsin-HCl-Verdauung gewonnen werden. Die mächtigste Förderung erfährt aber die Salzhydrolyse durch jene eigenartigen albumosenähnlichen Spaltprodukte, die *R. Neumeister* schon vor vielen Jahren ¹⁾ durch Behandlung von Eiweißstoffen mit gespannten Wasserdämpfen erhalten und als „*Atmidalbumin*“ und „*Atmidalbumose*“ beschrieben hat, deren charakteristische Reaktionen eine merkwürdige Übereinstimmung mit jenen der „*Speichelalbumose*“ zeigen, dem eigenartigen Proteid, welches in die Zusammensetzung anscheinend aller Diastasen eingeht und aus Parotisspeichel des Menschen mit Leichtigkeit rein gewonnen werden kann. Erhitzt man einige Gramm gekochtes oder rohes Blutfibrin mit destilliertem Wasser im zugeschmolzenen Glasrohr 1 bis 2 Stunden auf 160 bis 170°, so erhält man leicht getrübe, gelblich gefärbte Lösungen, welche sich bei Zusatz von HNO₃ stark trüben. Die Trübung verschwindet beim Erhitzen unter Gelbfärbung und kehrt beim Erkalten wieder; ebenso wirkt Pikrinsäure, aber auch HCl und Essigsäure geben starke Niederschläge, die sich in der Hitze lösen und in der Kälte wiedererscheinen. Dadurch unterscheiden sich diese Eiweißstoffe von allen anderen,

¹⁾ Zeitschr. f. Biol. 26.

sowie auch von den Verdauungsalbumosen, *stimmen aber in diesem Punkte überein mit der Speichelalbumose.*

Wiederholt man nun mit einer solchen Lösung die oben beschriebenen Versuche, so erfolgt der Abbau der Amylose in den mit Luft geschüttelten salzhaltigen Mischungen unter dem Einfluß der zugesetzten Albumosenlösung in der Regel so rasch, daß schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde die Jodreaktion negativ wird.

Die Wirkung einer solchen sauerstoffhaltigen Mischung von an sich nur schwach aktiven anorganischen Salzen und Atmidalbumosen läßt sich daher wohl schon mit der einer sehr verdünnten Diastase-lösung vergleichen, und es steht zu hoffen, daß sich die Herstellung einer solchen „künstlichen Amylase“ noch wesentlich wird verbessern lassen.

Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweiß-Chlorophylllösungen.

Von

M. Eisler und L. Porthelm ¹⁾.

(Aus dem Staatlichen serotherapeutischen Institut in Wien und aus der Biologischen Versuchsanstalt der Akademie der Wissenschaften in Wien, Botanische Abteilung.)

(Eingegangen am 13. November 1922.)

In unserer Abhandlung „Über Fällungsreaktionen in Chlorophyll- und anderen Farbstofflösungen“²⁾ haben wir darauf hingewiesen, daß in Extrakten, welche mit 95proz. Alkohol aus grünen Blättern hergestellt wurden, durch wässrige Eiweißlösungen eine Fällung, welche aus einer Eiweißchlorophyllverbindung besteht, erhalten wird.

Diese Eiweißchlorophyllverbindung ist, je nachdem mehr oder weniger Eiweiß in ihr enthalten ist, vollkommen, oder nur zum Teil in Wasser löslich und hat im Gel- und Sol-Zustande gewisse gemeinsame Eigenschaften mit dem Chlorophyll des lebenden Blattes.

Aus dem durch Eiweißzusatz in alkoholischen Blattauszügen erhaltenen Niederschlage ist das Chlorophyll mit 95proz. Alkohol extrahierbar, und dieser Auszug liefert, mit Benzol geschüttelt, die grünen und gelben Chlorophyllkomponenten. Die spektroskopische Untersuchung ergab bei der wässrigen Eiweißchlorophylllösung und beim lebenden Blatte ähnliche Resultate. Die kolloidalen Chlorophylllösungen und die lebenden Blätter der zur Herstellung der Niederschläge verwendeten Pflanzenarten erscheinen im durchfallenden Lichte gelblichgrün, im auffallenden grün, ohne gelblichen Ton, und beide zeigen nur, vor eine Reichertsche Fluoreszenzeinrichtung gebracht, Fluoreszenz. Schließlich sei noch erwähnt, daß wässrige Eiweißchlorophylllösungen und wässrige Blattauszüge im Lichte auf rote Blutkörperchen von Kaninchen hämolytisch wirken.

¹⁾ Ein Auszug dieser Arbeit erscheint unter dem Titel: Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweißchlorophylllösungen. Vorläufige Mitteilung von M. Eisler und L. Porthelm, (Mitteilungen aus dem Staatlichen serotherapeutischen Institut und aus der Biologischen Versuchsanstalt der Akademie der Wissenschaften in Wien) im Akademischen Anzeiger 1922, Nr. 19.

²⁾ M. Eisler und L. Porthelm, Akademischer Anzeiger Nr. 2—3, Wien 1922. M. Eisler und L. Porthelm, diese Zeitschrift 180, Heft 4/6, 1922.

Wir sind nun weiter gegangen und haben versucht festzustellen, ob bezüglich des Gasumsatzes in unseren Eiweißchlorophyllösungen und in lebenden grünen Blättern eine Ähnlichkeit besteht, ob also bei unseren Lösungen im Lichte die Sauerstoffproduktion zum Ausdruck kommt, während im Dunkeln die Atmung rein wahrzunehmen ist.

Bisher sieht man freilich die Zerlegung des Kohlendioxyds im Lichte durch das grüne Blatt, also die Kohlensäureassimilation als eine Funktion des lebenden Organismus an¹⁾ und bei Versuchsergebnissen, durch die man das Gegenteil festzustellen suchte, konnten Fehler nachgewiesen werden, so daß sie nicht einwandfrei erschienen²⁾.

Nun hat aber *Molisch*³⁾ mittels der Leuchtbakterienmethode zeigen können, daß abgetötete Blätter von *Lamium album*, zerrieben und mit Wasser aufgeschwemmt, im Lichte Sauerstoff ausscheiden, und *Molisch* spricht geradezu von postmortaler Assimilation⁴⁾.

Ein großer Teil der Untersuchungen über die Zerlegung des CO₂ im Lichte durch Chloroplasten außerhalb der Zelle, durch abgetötete Blätter und durch Fermente, welche aus den Blättern gewonnen wurden, wurde mittels der biologischen Methoden [*Engelmann* sche Bakterienmethode⁵⁾, *Beyrincks* Leuchtbakterienmethode⁶⁾], durchgeführt. Diese Methoden zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, doch haften ihnen verschiedene Nachteile an⁷⁾. Um diese Fehlerquellen und Mängel zu vermeiden und einen exakten Nachweis für die Bildung von Sauerstoff bzw. die Zerlegung der Kohlensäure zu ermöglichen, haben wir zu unseren Untersuchungen die gasanalytischen Methoden herangezogen. Diese wurden durch die Arbeiten der letzten Zeit so weit vervollkommenet, daß sie einen einfachen und exakten Nachweis auch kleiner Sauerstoffmengen, auf die es uns bei den zu besprechenden Versuchen vor allem ankam, gestatten. Wir benutzten den *Haldane* schen⁸⁾ Differentialblutgasapparat und den *Haldane* schen⁹⁾ Gasanalyseapparat.

¹⁾ *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie 1, 2. Aufl., 286, 1897.

²⁾ *F. Czapek*, Biochemie der Pflanzen 1, 2. Aufl., 552—554, 612—613, 1913.

³⁾ *H. Molisch*, Botanische Zeitung 22, I. Abt., 1, 8, 1904. Derselbe, Zur Lehre von der Kohlensäureassimilation im Chlorophyllkorn. Wissenschaftliche Ergebnisse des internationalen botan. Kongresses in Wien 1905 1906, S. 179.

⁴⁾ Derselbe, l. c., 1902, S. 8.

⁵⁾ *Th. W. Engelmann*, Botanische Zeitung 1881, S. 446.

⁶⁾ *Beyrinck*, zit. nach *Molisch*, l. c., 1904.

⁷⁾ *H. Molisch*, l. c., 1904, S. 9.

⁸⁾ *Haldane*, Journ. of pathology and bacteriology 1919.

⁹⁾ Derselbe, Journ. of hygienie 6.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir Gras, welches in Reibschalen mit 95proz. Alkohol zerrieben wurde. Dem intensiv gefärbten Extrakte, der nach der Filtration vollständig klar war, setzten wir 20fach verdünntes Pferdeserum im Verhältnis 4:1 zu. Nachdem innerhalb einiger Minuten deutliche Flocken aufgetreten waren, wurden die Röhrchen scharf zentrifugiert, der Alkohol abgegossen und dessen letzte Spuren durch Absaugen mittels Filtrierpapier entfernt. Die Lösung des Sediments erfolgte in einer der ursprünglichen Alkoholmenge entsprechenden Quantität einer 0,85proz. Kochsalzlösung.

Bei einer Reihe von Versuchen kam statt der Kochsalzlösung eine m/10-Lösung von Natriumbicarbonat und Natriumcarbonat im Verhältnis von 85:15 zur Verwendung¹⁾. Während bei diesen Versuchen die Versorgung der Eiweißchlorophyllösung mit dem erforderlichen Kohlensäurequantum aus der Carbonatlösung erfolgte, wurde bei anderen die Kohlensäure durch Einblasen von Expirationsluft oder durch Einleiten aus einem Gasometer zugeführt.

Für die Versuche mit dem Differentialblutgasapparat kamen je 10 ccm der Eiweißchlorophyllösung in zwei etwa 25 ccm fassende Glasbirnen mit eingeschliffenem Ansatz, von denen eine mittels schwarzen Papiers vor Lichtzutritt geschützt war. Beide Birnen wurden so weit in ein Wasserbad versenkt, daß sie vollkommen vom Wasser bedeckt waren. Die Aufstellung der Glaswanne mit den beiden Birnen erfolgte nun in der Weise, daß sie intensivem Sonnenlichte ausgesetzt war.

Über die Versuchsergebnisse gibt der nachfolgende Auszug aus den Protokollen Aufschluß²⁾.

Nachdem in den beiden Birnen Temperatenausgleich und am Apparat Einstellung der beiden Schenkel auf ein gewisses Niveau erfolgt war, fing das Manometer an zu sinken. Nach Verdunkelung des Raumes wurde die Bewegung des Manometers sistiert; Wiederbelichtung hatte ein neuerliches Sinken zur Folge. Nicht nur Verdunkelung, sondern eine bloße Herabsetzung der Lichtintensität durch eine die Sonne bedeckende Wolke führte schon zum Stillstande.

Ähnliche Resultate erzielten wir, wenn in die Birnen mit Chlorophyllkochsalzlösungen Kohlensäure eingeleitet worden war.

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß in der dem Lichte ausgesetzten, die Eiweißchlorophyllösung enthaltenden Birne ein Überdruck aufgetreten sein muß.

¹⁾ O. Warburg, diese Zeitschr. 100, 230, 1919.

²⁾ Nicht alle Versuche haben, wie es bei solchen Experimenten selbstverständlich ist, so starke Ausschläge ergeben, wohl aber sind alle in gleichem Sinne verlaufen.

30. Mai 1922. *Versuch* mit je 10 ccm einer dunkelgrünen Eiweißchlorophylllösung in der Licht- und Dunkelbirne. Die Eiweißchlorophyllverbindung ist in einer m/10-Lösung von NaHCO_3 und Na_2CO_3 gelöst.

Zeit	Stand der Wassersäule im Manometer ccm	Belichtet oder verdunkelt	Luft- temperatur °C
11 ^h 10'	0,03	belichtet	25
11 50	0,17	"	
11 50	0,17	verdunkelt	
12	0,17	"	
12	0,17	belichtet, starke Sonne	26
12 9	0,285	belichtet	
12 9	0,285	verdunkelt	
12 19	0,27	"	
12 19	0,27	belichtet, starkes Licht	
12 42	0,42	belichtet	
12 42	0,42	verdunkelt	26
12 50	0,41	"	25 ¹ / ₂
12 50	0,41	belichtet	
1 10	0,54	"	25,7

Wir prüften nun weiter die Zusammensetzung des Gasgemisches, wobei wir uns auf die Bestimmung des Kohlendioxyd- und Sauerstoffgehalts im Luftraum der belichteten und verdunkelten Glasgefäße mittels des *Haldaneschen* Gasanalyseapparats beschränkten.

Die zu diesen Versuchen verwendeten Glasgefäße, von etwa 35 ccm Inhalt, waren mit einem doppelt durchbohrten Gummistöpsel verschlossen. Durch die Bohrungen wurden rechtwinklig gebogene Glasröhren eingeführt, von denen eine bis auf den Boden des Gefäßes reichte, die andere ganz kurz war. Die beiden Glasröhren trugen an ihren freien Enden kurze Gummischläuche, welche durch Klemmen verschlossen werden konnten.

Auch bei diesen Versuchen wurde ein Glasgefäß, das 10 ccm der Eiweißchlorophylllösung enthielt, dem Sonnenlicht ausgesetzt, während die Lösung in einem zweiten Glasgefäße durch schwarzes Papier vor Belichtung geschützt war.

Nachdem die Versuchsgefäße mehrere Stunden belichtet worden waren, wurde zum Überleiten des Gases in den *Haldane*-Apparat das kurze Glasrohr des Gefäßes mit dem Apparat verbunden und durch Eingießen von Quecksilber durch das lange Rohr das Gas aus dem Luftraume des Glasgefäßes verdrängt und in den Apparat eingesaugt.

Zuerst wurde der CO_2 -Gehalt dieser Luft bestimmt; die gewonnenen Zahlen können aber, wegen der von uns verwendeten Methodik, nicht als Maßstab für den gebildeten Sauerstoff herangezogen werden.

Es folgte nun die Bestimmung des Sauerstoffgehalts. Aus der Zusammenstellung der für den Sauerstoffgehalt erzielten Zahlen ist

zu ersehen, daß regelmäßig eine Sauerstoffzunahme in dem belichteten Glasgefäße festzustellen war.

Die absoluten Zahlen bei den Versuchen mit eingeleitetem CO_2 sind weniger beweisend, da die Feststellung der eingeleiteten Menge nur approximativ erfolgte.

Nummer des Versuchs	Datum 1922	Objekt	Art der Zufuhr des CO_2	In den Glasgefäßen im Licht und Dunkeln gebildete Sauerstoffmenge in %		Differenz Licht gegen Dunkel in o/o
1	20. V.	Wässrige Lösung d. Eiweiß-chlorophyll-Verbindung	Eingehauchte Expirationsluft	21,4	20,4	+ 1
2	20. V.	dasselbe	dasselbe	—	19,6	+ 1,8
		dasselbe	Durchperlung von CO_2	19,7	19,2	+ 0,5
3	20. V.	<i>Elodea canadensis</i>	dasselbe	22,5	20,2	+ 2,3
4	25. V.	Wässrige Lösung d. Eiweiß-chlorophyll-Verbindung	dasselbe	21,1	17,1	+ 4
		dasselbe	dasselbe	21,6	—	+ 4,5
5	?	dasselbe	dasselbe	19,9	17,5	+ 2,4
6	31. V.	dasselbe	m/10- NaHCO_3 u. Na_2CO_3	20,6	—	—
7	2. VI.	dasselbe	dasselbe	20,6	—	—
		dasselbe	dasselbe	22,4	—	—
8	9. VI.	dasselbe	dasselbe	21,4	20,5	+ 0,9
9	9. VI.	dasselbe	dasselbe	21,4	20,5	+ 0,9
10	16. VI.	dasselbe	dasselbe	21,8	20,7	+ 1,1
11	28. VI.	dasselbe	dasselbe	21,7	20,5	+ 1,2
12	5. VII.	dasselbe	dasselbe	22,5	20,3	+ 2,2
		dasselbe	dasselbe	22,8	—	+ 2,5

Wir haben also regelmäßig einen höheren Gehalt von Sauerstoff bei Anwesenheit von Kohlensäure im Lichte gegenüber der Dunkelprobe wahrnehmen können. Diese Zunahme der Sauerstoffmenge kann nur auf eine im Lichte vor sich gehende Zerlegung des CO_2 zurückgeführt werden.

Auf S. 552 der zweiten Auflage der Biochemie der Pflanzen sagt Czapek¹⁾: „Es ist wohl sicher, daß sowohl die kolloidal gelösten Chloroplastenpigmente (und etwa vorhandene nicht farbstoffartige Lipokolloide) als auch die als Stroma bezeichneten eiweißartigen Hydrokolloide der Chloroplasten unentbehrlich sind, weil nur ihr ungelöstes Gefüge das funktionstüchtige Chlorophyllkorn ausmachen kann.“

¹⁾ F. Czapek, Biochemie der Pflanzen 1, 552, 1913.

Und bei Besprechung der Versuche von *Friedel*¹⁾, der CO_2 -Zerlegung und Sauerstoffbildung im Lichte beobachtete, wenn er Glycerinextrakte aus frischen Blättern mit getrockneten, fein gepulverten Blättern zusammenbrachte, bemerkt *Czapek*²⁾: „Es ist in der Tat auch sehr unwahrscheinlich, daß man auf diesem Wege zu einem positiven Resultate gelangen kann, weil es zu den ersten Vorbedingungen gehören müßte, den Chlorophyllfarbstoff mit dem Stroma in die feinste und innigste Mischung zu bringen, was in der beschriebenen Weise unmöglich erreicht werden kann.“

Wir besitzen in dem von uns verwendeten Eiweißchlorophyllpräparate eine Verbindung, bei der die beiden Komponenten in feinsten und innigster Weise vermischt sind, und haben es in der Hand, den Dispersitätsgrad dieser Verbindung nach Belieben zu ändern.

Wir glauben in unserer Eiweißchlorophyllverbindung ein Chloroplastenmodell dargestellt zu haben, ähnlich wie die Kohle- und Eiweißmodelle, welche *Warburg*³⁾ und insbesondere *Ellinger*⁴⁾ zum Nachweise der Atmung außerhalb des Organismus verwendeten.

Es wurde bereits oben erwähnt, daß die von uns hergestellte Eiweißchlorophylllösung gewisse Eigenschaften besitzt, die mit denen des lebenden Blattes übereinstimmen, wie z. B. die Farbe, das Spektrum und die Fluoreszenz. Bei den bisherigen Untersuchungen, welche sich mit der Zerlegung des CO_2 außerhalb der Pflanze beschäftigten, wurden aber teils Chlorophyllpräparate verwendet, welche in ihren Eigenschaften von dem lebenden Blatte stark abwichen, teils wurde Material benutzt, das noch Chloroplasten enthielt, bei denen daher nach den Versuchen von *Engelmann*, *Haberlandt* und *Ewart*⁵⁾ Assimilation noch möglich war.

Unsere Beobachtungen, welche eine Assimilation⁶⁾ durch von natürlichen Chloroplasten freie Lösungen annehmen lassen, sind als der Beginn einer Reihe von Versuchen⁷⁾ anzusehen, welche über den Gasaustausch in unseren Eiweißchlorophylllösungen im Lichte und im Dunkeln Aufschluß geben sollen.

¹⁾ *J. Friedel*, C. r. 133, 840, 1901.

²⁾ *F. Czapek*, l. c., 1913, S. 612.

³⁾ *O. Warburg* und *Negelein*, diese Zeitschr. 113, 1921; *O. Warburg*, ebendasselbst 119, 1921.

⁴⁾ *Ph. Ellinger*, Zeitschr. f. physiolog. Chemie 119, 11, 1922.

⁵⁾ Siehe *F. Czapek*, l. c., 1913, S. 552.

⁶⁾ Der Ausdruck Assimilation wird von uns in dieser Abhandlung für die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd gebraucht.

⁷⁾ Diese weiteren Arbeiten werden wir gemeinsam mit Herrn D. Loew vornehmen, der uns bei der Durchführung der bisherigen Versuche bestens unterstützt hat.

Über das Vorkommen von p-Oxybenzaldehyd und p-Oxybenzoesäure bei der bakteriellen Tyrosinzerersetzung, mit besonderer Berücksichtigung des dabei gebildeten Melanins.

Von
Kinsaburo Hirai.

(Aus dem Sasaki-Laboratorium im Kyoundo-Hospital zu Tokio.)

(Eingegangen am 13. November 1922.)

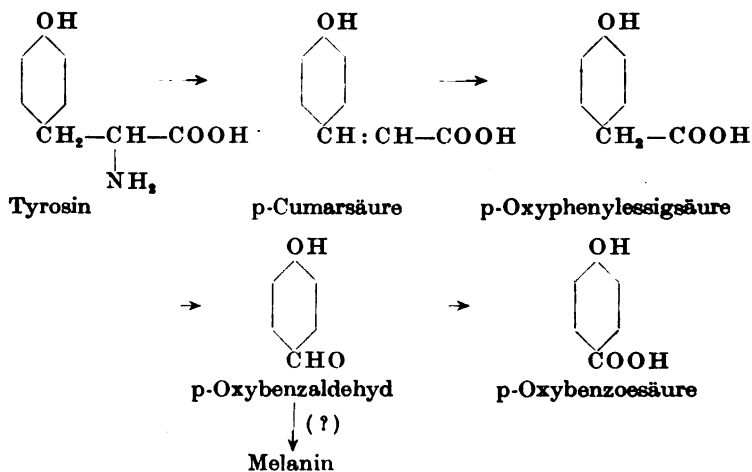
Vor einiger Zeit berichtete ich über die bakterielle Bildung der p-Cumarsäure, eines zum ersten Mal durch einen direkten Versuch nachgewiesenen Zwischenproduktes der Tyrosinzerersetzung¹⁾, wenn man l-Tyrosin in *Ringerscher* Lösung der Einwirkung von *Proteus vulgaris* aussetzt. Diese Säure wird bei längerer Wirkungsdauer weiterhin zur p-Oxyphenylelessigsäure oxydiert. Damals dachte ich, daß diese p-Oxyphenylelessigsäure infolge der Oxydation nach dem allgemein angenommenen Schema ausschließlich in p-Kresol oder Phenol umgewandelt werden kann. Bei einer noch länger dauernden Bakterieneinwirkung auf l-Tyrosin konnte ich unerwarteterweise auch p-Oxybenzaldehyd als ein Abbauprodukt isolieren.

Der Verlauf der Umwandlung von l-Tyrosin bei der Bakterieneinwirkung stellt einen sehr komplizierten Vorgang dar, wie ich in meiner vorigen Arbeit andeutete; es gibt nämlich sehr verschiedene Umwandlungsprodukte, je nach dem einwirkenden Bakterienstamm, der Dauer der Einwirkung und besonders nach der Art der Nährlösung. In der Absicht, die Bedingungen bei dem bakteriellen Abbauprozess einfacher zu gestalten, arbeitete ich zuerst immer mit demselben Bakterienstamm, der in unserem Laboratorium weiter gezüchtet war, ohne die Eigenschaft zu verlieren, in einem glycerinhaltigen Nährmedium p-Oxyphenylmilchsäure aus l-Tyrosin zu bilden. So war die vorliegende Arbeit durchgehends mit diesem *Proteus*-stamm und mit der *Ringerschen* Lösung als Nährmedium ausgeführt. Diesmal unterbrach ich den Versuch am 52. Tage und konnte p-Oxy-

¹⁾ Kinsaburo Hirai, diese Zeitschr. 114, 71, 1921.

benzaldehyd isolieren. Bei einer anderen Probe von einer längeren Verweildauer im Brutschrank (100 Tage) konnte ich 0,1 g p-Oxybenzoesäure (aus 10 g l-Tyrosin) neben etwa 0,3 g p-Oxyphenylelessäure abscheiden. Die Trennung der beiden Säuren gelang dank ihrer weit differenten Löslichkeit in Wasser ganz leicht. Ob die Entstehung der p-Oxybenzoesäure sich dabei entweder um eine direkte Bakterienwirkung oder um eine Autoxydation des p-Oxybenzaldehyds handelt, kann man vorläufig nicht mit Sicherheit sagen. Jedenfalls ist die Tatsache experimentell festgestellt, daß die p-Oxybenzoesäure aus l-Tyrosin bei der bakteriellen Einwirkung entsteht. Als das bakterielle Fäulnisprodukt von l-Tyrosin wurde das p-Oxybenzaldehyd bisher niemals gewonnen, während Acetaldehyd, wie *Neuberg* und seine Mitarbeiter feststellten, sowohl durch Pilze¹⁾ als durch Bakterien²⁾ bei der Zersetzung von Zuckerarten leicht gebildet wird³⁾.

Wenn ich nun die Resultate meiner Experimente über Einwirkung von *Proteus vulgaris* auf l-Tyrosin in der *Ringerschen* Lösung zusammenstelle, so verläuft die Zersetzung wahrscheinlich wie das folgende Schema zeigt:



Bei der Einwirkung von *Proteus vulgaris* auf l-Tyrosin in *Ringerscher* Lösung beobachtete ich jedesmal eine auffällige Bildung eines schwarzen Farbstoffs nach Ablauf von etwa 3 Wochen im Brutschrank, was beim Versuche mit glycerinhaltigen Nährmedien merkwürdigerweise niemals der Fall war. Diese Schwarzfärbung

¹⁾ C. Neuberg u. C. Cohen, diese Zeitschr. 112, 139, 1920; 122, 204, 1921.

²⁾ C. Neuberg, F. Nord u. E. Wolff, ebendasselbst 112, 144, 1920.

³⁾ Vgl. C. Neuberg u. E. Reinfurth, ebendasselbst 89, 384, 1918.

trat erst im Spätstadium jedes Versuchs auf und erschwerte immer die Isolierung und Reinigung von p-Oxyphenylelessigsäure; dagegen war im früheren Zeitpunkt die Nährlösung orangegelb gefärbt, so daß keine Erschwerung der Isolierung und Reinigung von p-Cumarsäure sich geltend machte. Nach einiger Zeit wurde diese orangerote Färbung allmählich dunkler und schließlich schieden sich schwarze Flocken ab. Zwecks der weiteren Bearbeitung dieses an sogenannte Melanine erinnernden Körpers wurde er mit Alkohol erschöpfend extrahiert. Von diesem Extrakt wurde der Alkohol abdestilliert und der Rückstand mit wenig Wasser digeriert und abgesaugt. Da das dabei entstandene melaninartige Pigment nicht mehr in Wasser löslich ist, konnte ich es somit von in Wasser mehr oder weniger löslichen Substanzen trennen. Die weitere Reinigung des Melanins erfolgte durch wiederholte Umfällung von Melanin aus alkalischer Lösung mittels Säure, wobei hauptsächlich nur das Melanin als Niederschlag sich absetzt.

Das durch solche Methode gereinigte Melanin wandte ich zur Untersuchung an und das dadurch gewonnene Pigment bildete eine amorphe, schwarzbraune Masse, die leicht in Alkali, Alkohol, Eisessig, Methylalkohol, Aceton und Essigäther, schwer in Wasser, Mineralsäure, Äther, Chloroform und Benzol löslich war. Auch ist zu bemerken, daß die Löslichkeitsverhältnisse etwas anders als bei Melaninen aus anderer Quelle waren. Dieser Umstand kommt vielleicht von Verschiedenartigkeit der Melanine, wie *Abderhalden* und *Guggenheim*¹⁾ behaupten: „Auch ist zu betonen, daß die Einheitlichkeit der Melanine in keiner Weise erwiesen ist.“ Die Melanine aus anderen Quellen sind meistens in Alkohol unlöslich, ganz entgegengesetzt ist der Fall mit dem Melanin in meinem Versuch. Diesbezüglich ist die Arbeit von *W. Eller* und *K. Koch*²⁾ über Huminsäure bemerkenswert, denn die Huminsäure aus Phenol verhält sich etwas anders als dieselbe aus Resorcin oder Hydrochinon usw. und ist auch in Alkohol löslich. Das ähnliche Verhältnis kann auch bei den Melaninen existieren. Das Eisen und der Schwefel, welche beide oft als Bestandteile der Melanine angegeben wurden, konnte ich nicht in meinem Falle nachweisen, was selbstverständlich bei Verschiedenheit der Ausgangsmaterialien nicht befremdlich ist. Sehr mannigfaltig sind die Abbauprodukte der Melanine je nach den Quellen; so vermochte *F. Samuely*³⁾ Pyridin und phenolartige Substanz durch Reduktion des Melanins aus Serum-

¹⁾ *E. Abderhalden* u. *M. Guggenheim*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 333, 1907—1908.

²⁾ *W. Eller* u. *K. Koch*, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. 53, 1469, 1920.

³⁾ *F. Samuely*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 355, 1902.

albumin, *E. Spiegler*¹⁾ Methylidibutylelessigsäure aus Haarpigment, *H. Wolff*²⁾ Xyliton aus einem melanotischen Pigment der Leber zu isolieren. Obgleich ich über das Melanin noch nichts Exaktes zu sagen vermag, ist es doch nicht ohne Interesse; denn es entsteht aus einer bestimmten, chemisch gut bekannten Quelle, l-Tyrosin, und zwar in einer beträchtlichen Menge, so daß sie zur Darstellung und weiteren Untersuchung ausreichend ist. Von den pathologischen Pigmenten scheint das Melanin der Melanosarkome in einer nahen Beziehung hierzu zu stehen, indem *Primavera*³⁾ früher die interessante Beobachtung veröffentlicht hat, daß in Melanosarkomen Tyrosin in großer Menge vorkomme, daß mit der Zunahme des Melanins das Tyrosin abnehme, also eine innige Wechselbeziehung zwischen Tyrosin und Melanin bestehen müsse.

Die Bildung des schwarzen Farbstoffs aus l-Tyrosin in *Ringer*-scher Lösung durch *Proteus vulgaris* ist wahrscheinlich als Tyrosinase-wirkung zu betrachten, obgleich das Auftreten der Schwarzfärbung so spätzeitig erfolgt. Daß das Ferment nicht nur auf l-Tyrosin selbst, sondern auch auf etwaige Derivate des Tyrosins eingestellt ist, ist bekannt⁴⁾. Seit den Untersuchungen von *Bertrand*, *Bourquelot*, *Chodat*, *Fürth* usw. wissen wir, daß die Tyrosinase sowohl in Pflanzen wie auch in der tierischen Welt überall verbreitet ist. Ebenfalls ist über die Anwesenheit dieses Ferments in verschiedenen Mikroorganismen⁵⁾ vielfach berichtet. Die Erscheinung der starken Beschleunigung der Schwarzverfärbung beim Gebrauch von *Hendersonscher* Phosphatmischung als Nährmedium steht in gutem Einklang mit der fördernden Wirkung von Alkalizusatz auf Tyrosinase. In der Hinsicht ist das Auftreten der p-Oxyphenylelessigsäure und besonders des p-Oxybenzaldehyds bemerkenswert. Ob die letzte Substanz ein intermediäres Produkt der Tyrosinasewirkung vorstellt, ist vorderhand noch nicht mit Sicherheit zu sagen. In einem Versuche, bei welchem Platinschwamm in Nährlösung eingetaucht war, tritt die Dunkelfärbung frühzeitig und auffallend intensiv ein. Außer mit Tyrosin stellte ich dieselben Versuche mit anderen Aminosäuren an, wie l-Tryptophan, dl-Phenylalanin und l-Leucin, und in keinem Falle konnte ich unter denselben Bedingungen wie beim l-Tyrosin die Melaninbildung konstatieren.

¹⁾ *E. Spiegler*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 40, 1904.

²⁾ *H. Wolff*, ebendaselbst 5, 476, 1904.

³⁾ *Giornale internazionale delle scienze mediche* 1907, Nr. 21. Zit. nach *Oberndorfer*, Die pathologischen Pigmente, *Ergeb. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat.*, 19. Jhrg., 11. Abt., S. 57, 1921.

⁴⁾ *Abderhalden u. Guggenheim*, l. c.

⁵⁾ *Biochemisches Handlexikon* 5, 639.

Experimenteller Teil.

Versuch 1.

Isolierung von p-Oxybenzaldehyd aus l-Tyrosin durch Einwirkung von *Proteus vulgaris* in *Ringerscher* Lösung.

Zu dieser Untersuchung diente ganz dasselbe Verfahren, und zwar derselbe Stamm von *Proteus vulgaris*, wie beim Versuch in der vorigen Mitteilung¹⁾. Dabei konnte ich p-Cumarsäure nach zwölf-tägigem, p-Oxyphenylessigsäure nach 40-tägigem Einwirken des *Proteus vulgaris* isolieren. Diesmal wurden fünf Kolben, die 2 g l-Tyrosin, 800 ccm *Ringersche* Lösung und Bakterienemulsion aus fünf Schräg-Agarkulturen enthielten, 52 Tage lang im Brutschrank von 37° C gelassen. Während dieser Zeit verfärbte die Lösung allmählich immer dunkler und beim Herausnehmen aus dem Brutschranke war die ganze Lösung teerswarz. Nach der Prüfung auf bakterielle Reinheit wurde der Inhalt von fünf Kolben, der gegen Lackmuspapier neutral reagierte, vereinigt und mit 20proz. Lösung von Plumbum aceticum versetzt. Der entstandene, bräunlich schwarze, voluminöse Niederschlag wurde abgenutscht und mehrmals mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit Ammoniak versetzt und der gelblichweiße Niederschlag abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen. Das zweite Filtrat wurde nach dem Entbleien durch Schwefelwasserstoff unter vermindertem Druck eingeeengt und nach dem Zusatz von Natronlauge das Ammoniak durch Destillation beseitigt. Zwecks der Entfernung der Essigsäure wurde nochmals die Wasserdampfdestillation bei saurer Reaktion wiederholt. Der Destillationsrückstand wurde neutralisiert und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde abdestilliert, wobei der Rückstand in ganz feinen Nadeln kristallisierte, die weiter aus Wasser umkristallisiert wurden. Nach vorsichtigem Abdampfen des Wassers gewann ich eine geringe Menge nadelförmiger Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 117° C (unkorr.), die im Wasser sich leicht lösten, *Millonsche* Reaktion gaben und gegen Lackmuspapier neutral reagierten. Die wässrige Lösung der Substanz mit p-Nitrophenylhydrazin versetzt, zeigte die Aldehydnatur der Substanz, indem dabei sich schöne rote Kristalle abschieden, die bei 300° C noch nicht schmolzen. Der oben erwähnte Charakter stimmte gut mit p-Oxybenzaldehyd überein, und dazu gab es keine Schmelzpunktdepression bei der Mischprobe der Substanz mit synthetisch dargestelltem p-Oxybenzaldehyd.

¹⁾ Kinsaburo Hirai, diese Zeitschr. 114, 71, 1921.

Zur Charakterisierung stellte ich p-Nitrophenylhydrazon dar, das aus dem Alkohol umkristallisiert und für die Analyse bei 100°C getrocknet wurde.

0,1020 g Substanz	14,1 ccm N (14° C 755 mm)	
$C_{13}H_{11}O_3N_3$	Berechnet	Gefunden
N	16,34	16,27

Aus dem Bleiniederschlag konnte ich nichts außer Melanin isolieren.

In einem zweiten Versuche (vier Kolben, das sind 8 g Tyrosin, 52 Tage) konnte ich nur 0,06 g analysenreine Substanz bekommen, die im Vakuumexsikkator über Phosphorsäureanhydrid zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde.

0,0592 g Substanz	0,1485 g CO_2	0,0274 g H_2O
$C_7H_6O_3$	Berechnet	Gefunden
C	68,82	68,41
H	4,96	5,18

Die Mutterlauge der Ätherextraktion bei neutraler Reaktion wurde sauer gemacht und weiter mit Äther extrahiert. Aus diesem Ätherextrakt gewann ich nur wenig (etwa 0,1 g) p-Oxyphenylelessigsäure, die den richtigen Schmelzpunkt der p-Oxyphenylelessigsäure hatte und positive *Millonsche* Reaktion gab. Dieser Schmelzpunkt war unveränderlich bei der Mischprobe mit analytisch festgestellter p-Oxyphenylelessigsäure.

Versuch 2.

Isolierung von p-Oxybenzoesäure.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Versuch 1, nur die Verweildauer bedeutend länger, das ist 100 Tage.

Fünf Kolben mit je 2 g, das sind 10 g l-Tyrosin, wurden dabei der Einwirkung der Proteusbakterien ausgesetzt. Die weitere Ausarbeitung war wie Versuch 1. Aus der Bleifällung konnte ich nach dem Entfernen des Bleies und der Essigsäure durch Behandeln des Rückstandes des Ätherextraktes mit siedendem Wasser mikroskopische Prismen aus der zuerst ausgeschiedenen Fraktion gewinnen. Sie wog 0,1 g, zeigte *Millonsche* Reaktion nach vorsichtigem Erhitzen, schmolz bei 210 bis 211°C, und die Mischprobe mit synthetisch dargestellter p-Oxybenzoesäure zeigte keine Schmelzpunktsdepression. Aus anderen Fraktionen konnte ich etwa 0,3 g p-Oxyphenylelessigsäure isolieren. p-Oxybenzaldehyd konnte ich nirgends bei diesem Versuche finden, denn in jeder Fraktion war die p-Nitrophenylhydrazinprobe negativ.

Versuch 3.

Untersuchung der Melaninbildung aus l-Tyrosin durch Bakterien.

Bis jetzt beobachtete ich die Melaninbildung beim Einwirken von *Proteus vulgaris* auf l-Tyrosin in *Ringerscher* Lösung, und

zwar begleitet immer von der Bildung von p-Oxyphenylelessigsäure oder p-Oxybenzaldehyd. Bedeutend leicht und frühzeitig erfolgte das Auftreten des Pigments in der Lösung, in welcher *Hendersonsche* Phosphatmischung zugesetzt war. In diesem Versuche enthielt jeder Kolben 631 ccm *Ringersche* Lösung, 169 ccm *Hendersonsche* Phosphatmischung, 2 g l-Tyrosin und Bakterienemulsion aus fünf Agarkulturen. Im Falle, wo die *Ringersche* Lösung allein benutzt wurde, pflegte die Verfärbung der Lösung erst nach einem Monat langen Verweilen im Brutschrank aufzutreten. Der Zusatz von *Hendersonscher* Phosphatmischung beschleunigt das Phänomen bedeutend. Nach 2 Wochen war der Inhalt von allen Kolben schon ganz schwarz verfärbt. Im Gegensatz dazu sieht man aber solche schwarze Verfärbung niemals selbst nach 100 Tagen bei der Anwendung von glycerinhaltiger, eiweißfreier Nährlösung, in welcher immer p-Oxyphenylmilchsäure aus l-Tyrosin gebildet wurde. Eigentümlicherweise tritt die Melaninbildung bei Gegenwart von Platinschwamm *ceteris paribus* trotz der Anwendung derselben Nährlösung ganz massenhaft ein.

1. Versuch von einer längeren Dauer mit der glycerinhaltigen Nährlösung.

Ein Kolben mit ganz gleichem Inhalt wie beim Versuch 1 war 100 Tage, also zehnmal so lange, in den Brutschrank von 37° C gestellt; das Gemisch blieb jedoch ohne schwarze Verfärbung, und es wurde 0,9 g p-Oxyphenylmilchsäure gewonnen. Niemals war die Bildung von dem schwarzen Pigment zu bemerken. Es war immer so, daß die p-Oxyphenylmilchsäure spielend leicht von der Verunreinigung befreit wurde, während die Reinigung der p-Oxyphenylelessigsäure stets von begleitendem Melanin erschwert wird.

In einer engen Beziehung damit scheint das Auftreten von schwarzer Verfärbung bei der Bildung von p-Oxyphenylelessigsäure bei der Einwirkung von *Proteus vulgaris* auf l-Tyrosin in der Anwesenheit von Quecksilberoxydphosphat in eiweißfreier Nährlösung zu stehen¹⁾.

2. Versuch unter Zusatz von Platinschwamm.

Bei diesem Versuche wurde außer l-Tyrosin in glycerinhaltiger eiweißfreier Nährlösung noch 1,0 g Platinschwamm zugesetzt. Die Verweildauer von zwei Kolben (im ganzen 4 g l-Tyrosin) im Brutschrank von 37° C betrug 41 Tage. Interessanterweise verfärbte sich der Inhalt von zwei Kolben nach 18 Tagen ganz schwarz, wie

¹⁾ *Ichiro Otsuka*, diese Zeitschr. 114, 87, 1921. Er zeigte mir öfters solche schwarze Verfärbung, wenn er auch auf die Beschreibung dieses Befundes in seiner Arbeit verzichtete.

im Versuch mit *Ringerscher* Lösung. Kein faßbares Zersetzungsprodukt konnte ich bei diesem Versuche bekommen.

Beim Versuche unter Zusatz von Platinschwarz statt des Platinschwamms blieben zwei Kolben mit dem oben genannten Inhalt 41 Tage lang ohne schwarze Verfärbung im Brutschrank von 37° C. Dabei wurde als das Zersetzungsprodukt des l-Tyrosins 0,6 g p-Oxyphenylmilchsäure gefunden.

Zur Darstellung und Untersuchung des gebildeten Melanins benutzte ich die Bleifällung, in welcher das gesamte Melanin eingeschlossen war. Sie wurde pulverisiert, in Alkohol suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach dem Verjagen des überschüssigen Schwefelwasserstoffs wurde die alkoholische Lösung filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde nochmals in Alkohol gelöst, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Den Rückstand digerierte ich mit Wasser, dabei ging ein sehr geringer Teil des Melanins in die Lösung über, während der Hauptteil ungelöst als Rückstand auf dem Filter blieb. Das letztere wurde mit Alkohol aufgenommen, filtriert und nach dem Abdampfen des Alkohols getrocknet und pulverisiert. Dieselbe reinigte ich durch wiederholte Umfällung, nämlich Lösen in n-Natronlauge und Fällen mit verdünnter Schwefelsäure so lange, bis das Filtrat keine positive *Millonsche* Reaktion gab. Dies gelang nach 3- bis 4 maliger Umfällung. Das so gewonnene Melanin wog 0,5 g nach dem Trocknen (aus 4 g l-Tyrosin). Die Substanz enthielt weder Stickstoff noch Eisen und Schwefel; fast vollständig verbrennbar beim Glühen auf Platinblech; schwer löslich in Wasser, Mineralsäuren, Äther, Chloroform, Benzol; leicht löslich in Alkali, Alkohol, Ameisensäure, Eisessig, Methylalkohol, Aceton, Phenol und Essigäther. Sie schmolz unter 290° C nicht.

Das Melanin aus dem Versuche mit *Ringerscher* Lösung zeigte auch ganz dieselben Eigenschaften.

Mit dem Melanin versuchte ich verschiedene Operationen, wie Acetylieren, Benzoylieren, Reduktion und Oxydation, und konnte ich bis jetzt leider kein identifizierbares Produkt isolieren. Oxydation durch Wasserstoffsuperoxyd (3proz. Lösung), wie sie *C. Neuberg*¹⁾, *O. Risser* und *P. Rona*²⁾ angewandt hatten, gelang auch hier, als ich etwa messerspitzenweise Melanin in 50 ccm Wasserstoffsuperoxyd (3proz. Lösung) 30 Stunden lang auf dem Wasserbade erwärmte. Jedoch war ich nicht imstande, eine definierbare Substanz unter den Oxydationsprodukten zu finden.

¹⁾ *C. Neuberg*, Zeitschr. f. Krebsforsch. 8, 1909.

²⁾ *O. Risser* u. *P. Rona*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 109, 16, 1920.

Versuch 4.

Untersuchung über Melaninbildung aus einigen anderen Aminosäuren durch Bakterien.

Es ist wiederholt angegeben worden, daß eine andere Aminosäure als l-Tyrosin, z. B. l-Tryptophan, Prolin usw. zur Melaninbildung befähigt ist. So versuchte ich die Melaninbildung aus einigen Aminosäuren durch Bakterien in *Ringerscher* Lösung.

Versuch mit l-Tryptophan.

1 g l-Tryptophan wurde in 800 ccm *Ringerscher* Lösung gelöst, sterilisiert und mit Bakterienemulsion von fünf Agarkulturen versetzt. Beim 45tägigen Aufenthalt im Brutschrank von 37° C wurde die Lösung immer schön rot. Das Aussehen war ganz anders als beim Fall mit l-Tyrosin und verrät die Abwesenheit von Melaninbildung. Bei der Ausarbeitung des Reaktionsgemisches konnte ich kein Melanin isolieren. Ich bemühte mich vergeblich, nach der Analogie des Tyrosins daraus die Indolelessigsäure zu isolieren. Also in meiner Versuchsanordnung war es keine Melaninbildung aus l-Tryptophan in *Ringerscher* Lösung durch Bakterien nachweisbar.

Versuch mit dl-Phenylalanin.

H. Amatsu und M. Tsuji¹⁾ isolierten d-Phenylmilchsäure bei der Einwirkung von *Proteus vulgaris* auf dl-Phenylalanin in glycerinhaltiger Nährlösung mit *Hendersonscher* Phosphatmischung. Diesmal ließ ich *proteus vulgaris* auf dl-Phenylalanin in *Ringerscher* Lösung einwirken. Ich arbeitete mit nur einem Kolben, d. i. 2 g Phenylalanin. 45 Tage lang blieb die Lösung ganz klar und ungefärbt, daraus ich durch übliche Isolierungsmethode wie bei Tyrosin 0,1 g schuppenförmige Kristalle zu isolieren vermochte. Nach Umkristallisieren aus Wasser schmolzen die Kristalle bei 75 bis 76° C, so daß es sich höchstwahrscheinlich um die Phenylelessigsäure handelte.

Versuch mit l-Leucin.

2 g l-Leucin in 800 ccm *Ringerscher* Lösung gelöst und sterilisiert. Nach dem Erkalten wurde die Bakterienemulsion aus fünf Agarkulturen vereinigt und 45 Tage lang in den Brutschrank von 37° C gestellt. Während dieser Zeit war die Lösung immer klar und ungefärbt und zeigt somit, daß es keine Melaninbildung aus l-Leucin durch Bakterieneinwirkung in der *Ringerschen* Lösung gab. Durch weitere Behandlung konnte ich nichts daraus isolieren.

¹⁾ H. Amatsu u. M. Tsuji, Acta scholae med. universit. imper. in Kioto, 2, 447, 1918.

Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel bei Zuckerkranken.

I. Mitteilung.

Von

Robert Meyer-Bisch und Paul Thyssen.

(Aus der medizinischen Klinik Göttingen.)

(Eingegangen am 29. November 1922.)

Eine Reihe von Feststellungen, die auf dem Wege rein klinischer Beobachtung immer wieder bestätigt werden können, deuten darauf hin, daß bei schwereren Fällen von Diabetes mellitus außer der Kohlehydratstoffwechselstörung auch eine Veränderung des Wasser- und Salzstoffwechsels vorliegt. So ist es z. B. eine nicht seltene Erscheinung, daß hyperglykämische Diabetiker, ohne daß Azidosis besteht und ohne daß Zucker im Harn gefunden wird, eine stark erhöhte Tagesdiuresis von 3000 bis 4000 ccm haben. Diese Diuresesteigerung ist in der Regel durch eine Änderung der Nahrungszufuhr nicht zu beeinflussen. Ferner ist es eine seit längeren Jahren bekannte Tatsache, daß beim Diabetiker, besonders beim azidotischen, eine erhöhte Bereitschaft besteht, gleichzeitig mit verabreichten Salzen, besonders Natriumsalzen, Wasser zu retinieren und Ödeme zu bilden. Neuerdings berichtete Veil¹⁾ über Störungen des Cl-Stoffwechsels bei einem Diabetiker.

Andererseits hat sich gerade die Verabreichung von Salzen in Form von natürlichen Mineralwässern in der Therapie des Diabetes immer wieder behauptet. Vor allem die günstigen Erfolge, die Kuren mit Karlsbader Wasser mit sich bringen können, gaben Veranlassung, den tieferen Ursachen dieses therapeutischen Effekts nachzuspüren. Untersuchungen der neuesten Zeit [Paul Mayer²⁾ u. a.] ergaben nun, daß beim hyperglykämischen Diabetiker durch Verabreichung von Karlsbader Wasser der Blutzuckerspiegel zum Sinken gebracht werden kann. Jedoch scheint diese Eigenschaft nicht nur dem Karlsbader Wasser zuzukommen; ältere Versuche von Elias und Weiss³⁾ zeigen, daß intravenös gegebenes Mono- und Dinatriumphosphat ganz ähnliche Wirkungen zu entfalten pflegt.

¹⁾ 33. Kongreß für innere Medizin 1921, S. 284.

²⁾ Deutsch. med. Wochenschr., Jahrg. 48, S. 827, 1922.

³⁾ Berlin. klin. Wochenschr., 1921, Nr. 33.

So stehen wir der anscheinend paradoxen Erscheinung gegenüber, daß beim Diabetiker einerseits eine Mineral- und Wasserstoffwechselstörung besteht, die unter Umständen sogar zum Ödem führt, daß aber andererseits die diabetische Hyperglykämie durch die Verabreichung einzelner Mineralsalze günstig beeinflusst wird. Das Wesen der einen sowohl wie der anderen Feststellung ist uns heute noch völlig unklar, ebenfalls die Frage, ob sie für die Pathogenese der Zuckerkrankheit von Bedeutung sind. Nur so viel scheint aus ihnen hervorzugehen, daß beim Diabetiker irgend eine Störung des Mineralstoffwechsels besteht.

Der Gedanke, daß bei der ursprünglich unter rein organisch-chemischen Gesichtspunkten aufgefaßten pathologischen Physiologie des Diabetes mellitus auch Störungen des Ionengleichgewichts eine Rolle spielen könnten, ist nicht ganz neu. Schon im Jahre 1913 vertrat (*ohn*¹⁾ auf Grund von Feststellungen aus eigenen und fremden Untersuchungen den Standpunkt, daß bei dem Diabetes mellitus das K-Na-Gleichgewicht im Sinne einer Verminderung des Na und einer Vermehrung des K gestört sei. Mit einem weiteren Kation, dem Ca, beschäftigten sich neuerdings italienische Autoren²⁾. Durch Belastungsversuche glauben sie eine deutliche Störung des Ca-Stoffwechsels im Diabetikerorganismus nachweisen zu können. Die Frage der Anionen ist bisher wenig bearbeitet.

In dem Bestreben, einen tieferen Einblick in das Wesen einer nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen sehr wahrscheinlichen Mineralstoffwechselstörung beim Diabetiker zu gewinnen, verfolgten wir zunächst den Einfluß eines in der Therapie des schweren Diabetes am meisten gebrauchten Salzes, des Natriumhydrocarbonats, auf die Blutzusammensetzung.

In der Regel gingen wir in der Weise vor, daß wir den Patienten morgens nüchtern zunächst Blut aus der Armvene und aus dem Ohr läppchen entnahmen und sie dann 50 g Natrium bicarbonicum in 200 ccm Wasser trinken ließen; die Blutentnahme wurde danach nach 2 bis 3 Stunden, ferner am Abend des Versuchstages und endlich am Morgen des nächsten Tages wiederholt. Gleichzeitig wurde die Diurese gemessen; das Körpergewicht wurde täglich zweimal festgestellt. In dem dem Ohr läppchen entnommenen Kapillarblut wurden Erythrocyten in der *Thoma-Zeiss*schen Zählkammer, Hämoglobin im *Sahl*ischen Hämometer, Eiweißgehalt mit dem *Pulfrich*-schen Refraktometer, NaCl³⁾ und Zucker nach den *Bangs*chen Mikromethoden bestimmt. Von dem aus der Armvene entnommenen Blut wurde der eine Teil zur Bestimmung der Alkalireserve nach *van Slyke* in Natriumoxalat aufgefangen, im anderen Teil wurde nach Koagulation das abgepreßte

¹⁾ Deutsch. med. Wochenschr. **39**, 1930, 1913.

²⁾ *Goldi* und *Puxeddu*, Ref. Kongr. Zentralbl. **24**, 117.

³⁾ Die gefundenen Cl-Werte sind in den Tabellen stets als NaCl berechnet.

Serum abgehoben und auf seinen Kalkgehalt nach *de Waard* sowie auf seinen Schwefelsäuregehalt nach einer von dem einen von uns an anderer Stelle¹⁾ angegebenen Methode analysiert.

Die Ergebnisse sollen im folgenden kurz besprochen werden. Es kamen vier Fälle von Diabetes mellitus und fünf Normalfälle zur Untersuchung.

1. Diabetes mellitus.

Fall 1. Franz M., 36jähriger Mann. Einlieferung in die Klinik am 2. März 1921 wegen eines in englischer Gefangenschaft in den Jahren 1917 und 1918 entstandenen Diabetes mellitus schweren Grades mit leichter Acetonurie. Während des über ein Jahr dauernden Klinikaufenthalts war der Zustand wechselnd; zeitweise nahm die Azidosis bedrohliche Grade an. Im Frühjahr 1922 trat unter ausschließlicher Kohlehydrat-Fettdiät eine deutliche Besserung ein; es wurden nur noch geringe Mengen von Aceton und Zucker ausgeschieden. Versuche mit Eiweißzulage bewirkten stets sofortige Verschlechterung.

Nachdem am 8. Juli 1922 eine einmalige Untersuchung des Blutes vorgenommen worden war, wurde am 24. Juli mit dem Versuch begonnen. Tabelle I zeigt, daß nach der Verabreichung von 30 g Natrium bicarbonicum am 26. Juli der Kalkgehalt des Blutes von 12,2 Proz.-mg auf 10,8 Proz.-mg heruntergeht, nach dreitägigem Aussetzen des Mittels findet sich am 1. August wieder der Vorversuchswert von 12,3 Proz.-mg. Die übrigen Werte zeigen keine wesentliche Verschiebung; nur am 29. Juli morgens findet sich gleichzeitig mit einem deutlichen Gewichtsanstieg eine Zunahme des Blutkochsalzgehalts. Die Bestimmung der Alkalireserve ergab, daß während der ganzen Zeit eine Azidosis nicht bestand. Bei Schluß der Beobachtung war der Schwefelsäuregehalt des Blutserums auf über die Hälfte des bei Versuchsbeginn gefundenen Wertes gesunken (Tabelle I).

Fall 2. Franz Kurkov. 34 Jahre alt, Einlieferung am 15. Mai 1921. 5 bis 6 Monate vor der Aufnahme stellten sich bei dem Patienten im Anschluß an eine fieberhafte Erkrankung unklarer Art starker Durst und fast unstillbarer Hunger ein. Die Beobachtung ergab Diabetes mellitus. Die Acetonurie war stets gering. Die Glykosurie verschwand durch Diätbehandlung; der Blutzuckerspiegel bewegte sich aber stets um 0,200 %.

Am 31. Juli wurden zum erstenmal 50 g Natrium bicarbonicum per os gegeben. 24 Stunden später war der Gesamtschwefelsäuregehalt des Blutes (Sulfat- + Esterschwefelsäure) von 20,4 auf 39,8 Proz.-mg gestiegen, NaCl- und Zuckergehalt waren unverändert, der Ca-Spiegel zeigte eine leichte Abnahme. An diesem und an den folgenden Tagen entwickelte sich eine deutliche Wasserretention, die sich in Serumverdünnung und Gewichtszunahme äußerte. Die CO₂-Kapazität des Serums blieb unverändert.

Am 8. August wurde der Versuch wiederholt. Dieses Mal konnte schon 3 Stunden nach der Aufnahme von Natrium bicarbonicum eine deutliche Ca-Abnahme im Blute beobachtet werden, die bis zum Abend noch weiter zunahm und die bis zum Morgen des übernächsten Tages wieder ausgeglichen war. Die Schwankung betrug 1,4 Proz.-mg. Der Gesamtschwefelsäuregehalt nahm zunächst wie beim ersten Versuch deutlich zu, später jedoch wieder deutlich ab. NaCl im Blutserum blieb unverändert; der Blutzuckerspiegel stieg deutlich an. Die Hydrämie war wie beim ersten

¹⁾ Wolfgang Heubner und Robert Meyer-Bisch, diese Zeitschr. 122, 120.

Versuch deutlich, jedoch diesmal ohne gleichzeitige Gewichtszunahme. Die Alkalireserve im Blute stieg nach 3 Stunden von 62 auf 80 % und sank allmählich wieder auf den Vorversuchswert (Tabelle I).

Tabelle I.

Datum	Gew.	H ₂ SO ₄			NaCl	Zucker	Ca	Refr.	Hb.	Erythr.	CO ₂ %	Bemerkung
		freie	geb.	Ges.								
Fall 1. Franz M. Diabetes.												
8. VII.	—	41,6	7,2	48,8	0,56	0,337	—	7,72	—	—	—	
24. VII.	60,4 61,2	—	—	—	0,57	0,249	12,2	7,22	—	—	66	
25. VII.	59,3 60,8	—	—	—	0,57	0,262	—	7,85	84	5,37	—	
26. VII.	59,4 60,3	—	—	—	0,57	0,260	—	—	86	4,90	—	30 g Na-bi
27. VII.	59,2 60,2	—	—	—	0,55	0,233	10,8	8,00	93	5,26	66	
28. VII.	59,4 60,5	—	—	—	0,56	0,199	—	7,37	—	—	—	20 g Na-bi
29. VII.	60,3 60,4	—	—	—	0,60	0,244	—	7,61	78	—	—	20 g Na-bi
30. VII.	59,8 60,8	—	—	—	0,57	0,219	—	7,24	85	—	—	
1. VIII.	60,0 60,2	18,5	0,8	19,3	0,58	0,207	12,3	7,50	—	—	68	
Fall 2. Franz Kurkow. Diabetes.												
31. VII.	55,2 56,8	19,8	0,6	20,4	0,59	0,183	11,4	7,24	—	—	66	
1. VIII.	56,3 56,8	19,6	20,2	39,8	0,58	0,168	11,0	7,03	—	—	68	24 Stunden nach 50 g Na-bi
2. VIII.	56,4 57,3	—	—	—	0,60	0,164	—	6,51	—	—	—	
3. VIII.	56,7 57,5	—	—	—	0,61	0,280	—	7,59	—	—	—	
8. VIII.	57,0	33,4	3,1	36,5	0,61	0,213	12,2	7,29	75	5,52	62	50 g Na-bi
Morgens 8. VIII.	—	33,9	1,7	35,6	0,62	0,202	11,8	7,44	75	4,65	80	
Nach 3 Std. 8. VIII.	57,5	31,3	29,1	60,4	0,62	0,243	10,8	6,94	70	4,37	73	
Abends 9. VIII.	57,1 57,5	—	—	—	0,62	0,239	—	6,55	70	4,27	—	
10. VIII.	56,1 56,5	20,2	0,5	20,7	0,61	0,298	12,0	7,22	67	4,22	60	

Fall 3. Anna J., 38 Jahre alt. Einlieferung am 5. Juli 1922. Vor 3 Jahren Grippe mit großem Durst und Kopfschmerzen. Später wieder Wohlbefinden. Seit 6 Wochen hat Patientin ständig starken Durst und heftigen Hunger; trotzdem nimmt sie dabei an Gewicht ab. Seit 14 Tagen Brennen an der Vulva; bei der Aufnahme bestand bei einer Zuckerausscheidung von 5,5 % eine sehr starke Azidosis. Am 8. Juli entwickelte sich der Zustand des Coma diabeticum, CO₂-Kapazität des Serums am 9. Juli 28 %, Serumalbumen 8,05 %. Unter Natrium bicarbonicum-Behandlung besserte sich der Zustand sehr rasch. Am 9. August war der

Urin bei 100 g Brot aceton- und zuckerfrei. Am 11. August wurden 50 g Natrium bicarbonicum per os gegeben. 2 Stunden nach der Verabreichung war der Gehalt des Blutes an Sulfatschwefelsäure wesentlich erhöht, der Gesamtschwefelsäuregehalt jedoch durch Abnahme der Esterschwefelsäure deutlich herabgesetzt. Der Blutzucker nahm in dieser Zeit von 0,205 auf 0,146 % ab. Der Ca-Gehalt blieb derselbe. Serumalbumen, Hb. und Erythrocyten ließen durch ihre parallele Abnahme das Bild der Hydrämie entstehen. Abends lagen der Gesamt- und der Sulfatschwefelsäurespiegel wesentlich tiefer als vor dem Versuch. NaCl im Serum hatte deutlich abgenommen. Auch in diesem Falle zeigte der Ca-Gehalt eine zwar nicht sehr starke, aber deutliche Abnahme, die sich am Morgen des übernächsten Tages wieder ausgeglichen hatte. Blutzucker betrug wieder 0,220 %; von der anfänglichen Hydrämie war nichts mehr zu merken. An den folgenden Tagen entwickelte sich jedoch unter starker Hydrämie, unter Zunahme des Serum-NaCl und Gewichtszunahme eine starke Wasserretention, die erst vom 15. August ab allmählich zurückging. Die Alkalireserve im Blute stieg am Versuchstage von 62 über 74 auf 78 % und fiel am zweiten Nach-
tage auf 53 % (Tabelle II).

Fall 4. Anna Gr., 14 Jahre alt. Einlieferung am 17. August. Schwerer Diabetes. Trotz Diätbehandlung stets Glykosurie und Acetonurie.

Tabelle II.

Datum	Gew. 10. 8. 45.5	H ₂ SO ₄			NaCl	Zucker	Ca	Refr.	Hb.	Erythr.	CO ₂ %	Bemerkung
	freie	geb.	Ges.									
Fall 3. Anna J. Diabetes.												
11. VIII. Morgens	45,2	16,8	35,9	52,7	0,62	0,205	11,9	7,03	75	4,89	62	2 Stunden nach 50 g Na-bi
11. VIII.	—	32,8	1,3	34,1	0,62	0,146	11,9	6,27	68	4,81	74	
11. VIII. Abends	46,8	15,4	9,3	24,7	0,58	0,220	11,2	7,42	75	4,35	78	
12. VIII.	46,7 47,3	—	—	—	0,62	0,217	—	7,03	69	4,89	—	
13. VIII.	48,5 47,0	—	—	—	—	—	12,0	6,64	65	4,41	53	
14. VIII.	46,5 48,8	—	—	—	0,65	0,245	—	7,03	70	4,20	—	
15. VIII.	46,3	—	—	—	0,65	0,233	—	7,50	73	4,50	—	
Fall 4. Anna Gr. Diabetes.												
23. VIII.	31,3 31,3	—	—	—	0,59	0,340	—	6,98	83	6,70	—	
24. VIII. Morgens	31,3	18,5	5,0	23,5	—	0,281	11,5	7,05	82	6,47	52	
24. VIII.	—	14,7	0,0	14,7	0,60	0,301	9,9	6,72	83	6,32	76	3 Stunden nach 50 g Na-bi
24. VIII. Abends	31,0	15,6	1,3	16,9	0,58	0,345	11,6	6,68	76	4,73	58	
25. VIII.	30,6 31,0	—	—	—	0,59	0,329	—	6,42	82	5,22	—	
26. VIII.	30,7 31,5	16,8	0,8	17,6	0,59	0,259	11,5	6,44	71	4,83	48	

Am 5. September Exitus im Coma.

Am 23. August Versuchstag. Die Blutschwefelsäure nahm im Verlauf des Versuchs nicht sehr viel, aber deutlich ab; NaCl und Zucker schwankten nicht wesentlich. Dagegen senkte sich auch jetzt der Kalkspiegel deutlich, von 11,5 auf 9,9 Proz.-mg ab, hob sich jedoch bald wieder zur alten Höhe. Im Blute entwickelte sich eine deutliche Hydrämie, jedoch ohne Gewichtszunahme. Die CO_2 -Kapazität stieg von 52 auf 76 % und fiel dann wieder auf den deutlich unternormalen Wert von 48 %¹⁾ (Tabelle 11).

Zusammenfassend läßt sich über die vier besprochenen Fälle folgendes sagen:

Bei vier hyperglykämischen Diabetikern, von denen nur einer eine Azidosis zeigte, bewirkte Verabreichung von 50 g Natrium bicarbonicum ausnahmslos eine deutliche Herabsetzung des Blutkalkgehaltes. Der Schwefelsäuregehalt veränderte sich ebenfalls; wenn auch eine eindeutige Regel sich nicht ohne weiteres erkennen läßt, so erweckt doch eine genaue Betrachtung der Tabellen den Eindruck, daß Natrium bicarbonicum, zum Teil nach vorübergehender Steigerung, letzten Endes eine Abnahme von Sulfat- und Esterschwefelsäure verursacht. Der NaCl- und Blutzuckergehalt zeigt nur geringe Schwankungen. Letzterer nahm nur einmal, anscheinend unter dem Einfluß des genossenen Salzes, in deutlicher Weise ab. Es bedarf einer besonderen Betonung, daß in allen ausführlich beobachteten Fällen — Fall 1 scheidet aus diesem Grunde aus — die Verabreichung von Natrium bicarbonicum eine Hydrämie von kürzerer oder längerer Dauer bewirkt, zum Teil mit nicht unerheblicher Gewichtszunahme.

2. Normalfälle.

Angesichts der eingangs angestellten Erwägungen war es naturgemäß notwendig, nachzuweisen, inwieweit die im vorstehenden mitgeteilten Veränderungen der Blutzusammensetzung, deren markanteste vor allem die Herabsetzung des Kalkspiegels war, als pathologisch und für den Diabetes mellitus charakteristisch anzusehen waren.

Bei einer Reihe von nicht zuckerkranken Patienten wurde deshalb unter Einhaltung derselben Versuchstechnik in ganz analoger Weise der Einfluß von Natrium bicarbonicum auf die Blutzusammensetzung nachgeprüft. Das Ergebnis soll im folgenden kurz besprochen werden.

Fall 5. Heinrich B., 42 Jahre alt. Einlieferung in die Klinik wegen rheumatischer Beschwerden im linken Bein. Innere Organe ohne Befund.

Am 4. August wurden Patienten 50 g Natrium bicarbonicum nüchtern verabreicht. Aus Tabelle III geht hervor, daß der Ca-Gehalt völlig unverändert blieb. Auch der Cl-, Zucker- und Schwefelsäuregehalt des Blutes zeigte keine Veränderung. Als einzige Folge der Salzzufuhr trat eine deutliche Hydrämie mit Gewichtszunahme, d. h. eine Wasseranreicherung des Organismus ein, die am ersten und zweiten Nachtage von einem Ansteigen des Blutkochsalzspiegels begleitet war. Die CO_2 -Kapazität stieg von 52 % unter dem Einfluß des Natrium bicarbonicum vorübergehend auf 70 % (Tab. III).

¹⁾ Am 5. September starb Patientin im Coma diabeticum.

Tabelle III.

Datum	Gew.	H ₂ SO ₄			Na Cl	Zucker	Ca	Refr.	Hb.	Erythr.	CO ₂ %	Bemerkung
		freie	geb.	Ges.								
Fall 5. Heinrich B. Normalfälle.												
3. VIII.	62,5	—	—	—	—	0,000	—	—	—	—	—	
4. VIII.	—	29,0	1,1	30,1	0,60	0,129	11,4	7,05	78	5,38	52	
Morgens	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
4. VIII.	—	23,6	1,5	25,1	0,60	0,113	11,4	7,05	78	4,90	70	50 g Na-bi
2 Stunden	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
4. VIII.	64,0	25,0	0,0	25,0	0,61	0,119	11,4	6,31	78	4,68	64	
Abends	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5. VIII.	63,8	—	—	—	0,64	0,096	—	6,64	72	5,13	—	
	64,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
6. VIII.	63,5	—	—	—	0,64	0,117	—	7,14	79	5,47	—	
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Fall 6. Friedrich M.												
18. VIII.	—	27,8	11,4	39,2	0,62	0,128	9,8	7,01	89	5,46	52	
Morgens	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
18. VIII.	—	20,6	8,8	29,4	0,61	0,133	9,7	7,72	91	5,55	56	50 g Na-bi
2 Stunden	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
18. VIII.	—	14,1	0,4	14,5	0,60	0,117	9,8	6,57	—	—	62	
Abends	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
20. VIII.	—	35,8	14,3	50,1	—	—	9,8	—	—	—	62	

Fall 6. Friedrich M., 28 Jahre. Rekonvaleszent nach Pneumonie. Zur Zeit des Versuchs bestanden über der linken Thoraxhälfte noch Anzeichen geringgradiger pleuraler Verwachsungen.

Am 18. August Verabreichung von 50 g Natrium bicarbonicum. Auch in diesem Falle blieb vor allem der Ca-Gehalt des Blutes derselbe. Der an sich niedrige Wert von 9,8 Proz.-mg ist wohl auf die vorausgegangene Pneumonie zurückzuführen. Auch Zucker- und Cl-Gehalt blieben unverändert. Dagegen nahm der Schwefelsäuregehalt des Serums am Versuchstage auf über die Hälfte ab; bis zum übernächsten Tage stieg er jedoch wieder an und erreichte eine etwas über dem Vorversuchswert liegende Höhe. Das Blutserum zeigte während des Versuchs eine deutliche Verdünnung (Tabelle III).

Fall 7. August H., 26 Jahre alt. Aufnahme in die Klinik am 28. August 1922 wegen kombinierten Herzklappenfehlers. Zur Zeit des Versuchs bestanden keine Dekompensationserscheinungen. Auch hier bewirkte Natrium bicarbonicum keine Veränderung des Ca-Gehalts. Am Versuchstage nahm der Kochsalzspiegel des Blutes vorübergehend deutlich ab (Tabelle IV).

Fall 8. Albert Pfl., 32 Jahre. Aufnahme wegen rheumatischer Beschwerden. Kein sicherer pathologischer Befund. Auch hier blieb der Ca-Gehalt des Blutes während der ganzen Versuchsperiode vollkommen konstant (Tabelle IV).

Bei vier nicht diabetischen Kranken, die aus den verschiedensten Gründen die Klinik aufgesucht hatten, blieb also der Ca-Gehalt des Blutes nach Verabreichung von 50 g Natrium bicarbonicum vollkommen unverändert. Der Schwefelsäuregehalt blieb einmal unverändert, ein andermal nahm er vorübergehend stark ab. In allen Fällen fand sich

Tabelle IV.

Datum	Gew.	H ₂ SO ₄			NaCl	Zucker	Ca	Refr.	Hb.	Erythr.	CO ₂ %	Bemerkung
		freie	geb.	Ges.								
Fall 7. August H.												
30. VIII.	—	—	—	—	0,60	0,119	11,6	9,11	69	4,93	53	50 g Na-bi
Morgens												
30. VIII.	—	—	—	—	0,57	0,184	11,6	9,50	69	5,75	82	
3 Stunden												
30. VIII.	—	—	—	—	0,57	0,193	11,5	8,88	69	4,66	65	
Abends												
31. VIII.	—	—	—	—	—	—	—	9,56	71	—	—	
1. IX.	—	—	—	—	0,62	0,125	11,6	—	—	—	58	
Fall 8. Albert Pfl.												
11. IX.	73,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50 g Na-bi
12. IX.	72,3	—	—	—	—	—	11,2	7,20	—	—	—	
Morgens												
12. IX.	—	—	—	—	—	—	11,1	6,66	—	—	—	
2 Stunden												
12. IX.	72,3	—	—	—	—	—	11,1	7,09	—	—	—	
Abends												
13. IX.	72,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
13. IX.	73,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
14. IX.	72,5	—	—	—	—	—	11,1	7,09	—	—	—	

ferner eine wenige Stunden nach der Salzaufnahme manifest werdende Hydrämie, die bald wieder zurückging.

Ein weiterer, in derselben Weise untersuchter Fall zeigte ein von allen bisher besprochenen in mancher Hinsicht abweichendes Verhalten.

Fall 9. Henriette H., 33 Jahre. Suchte am 23. August wegen Rückenschmerzen die Klinik auf. Bei der Aufnahme fiel die Patientin durch ihr erregtes Wesen auf. Die Untersuchung ergab über der Herzspitze ein präastolisches Geräusch; es fand sich jedoch kein weiterer Anhaltspunkt für einen organischen Klappenfehler.

Schon wenige Stunden nach der Aufnahme von Natrium bicarbonicum am 26. August zeigte Patientin schwere Allgemeinerscheinungen. Brechen, Durchfall, Kopfschmerzen. Die Beschwerden dauerten bis zum Nachmittag an. Wie aus Tabelle IV hervorgeht, waren diese Symptome von einer Bluteindickung begleitet, die mit einer sich auch auf die folgenden Tage fortsetzenden Gewichtsabnahme einherging. Gleichzeitig mit der Blutkonzentrationszunahme setzte eine Abnahme des Ca-Gehalts ein, die sich bis zum Abend fortsetzte und die auch am 30. August noch nicht wieder ausgeglichen war. Der Schwefelsäuregehalt des Blutes, der schon vor dem Versuch leicht erhöht war, nahm nachher bis zu dem für Serum ungewöhnlich hohen Gehalt von 85,8 Proz.-mg zu. Die übrigen Werte zeigten keine Veränderung (Tabelle V).

Das Verhalten dieser Patientin nimmt vor allem dadurch eine Sonderstellung ein, daß bei ihr durch die Salzzufuhr eine zum mindesten mehrere Tage anhaltende Senkung des Ca-Spiegels eintrat.

In dieser Beziehung unterscheidet sich der Fall von den besprochenen Diabetesfällen, bei denen sich der frühere Ca-Gehalt stets

Tabelle V.

Datum	Gew.	H ₂ SO ₄			NaCl	Zucker	Ca	Refr.	Hb.	Erythr.	CO ₂ %	Bemerkung
		frei	geb.	Ges.								
Fall 9. Henriette H.												
25. VIII.	50,9 52,2	—	—	—	0,62	0,126	—	7,24	87	5,90	—	
26. VIII.	51,2	41,6	1,3	42,9	0,63	0,105	12,9	7,48	90	6,01	51	
Morgens	51,0											
26. VIII. 3 Stunden	—	42,9	0,8	43,7	0,61	0,149	12,1	8,06	86	6,20	76	50 g Na-bi
26. VIII. Abends	—	84,1	1,7	85,8	0,62	0,130	11,5	7,42	90	5,43	61	
27. VIII.	50,2 52,0	—	—	—	0,62	0,144	—	6,98	87	4,93	—	
28. VIII.	50,9 51,8	64,8	0,0	64,8	0,62	0,125	11,5	7,14	91	5,07	55	
30. VIII.	50,7 51,6	—	—	—	—	—	11,8	—	—	—	—	

noch während der Versuchsperiode wieder einstellte. Auch insofern besteht ein Unterschied, als Fall 9 auf die Natrium bicarbonicum-Zufuhr mit schweren Allgemeinerscheinungen und Bluteindickung antwortete, während die Diabetiker, soweit sie ausführlich genug beobachtet werden konnten, ausnahmslos eine deutliche Hydrämie zeigten. Die Bedeutung dieser Abweichung ist noch völlig ungeklärt.

Das Wesentliche der mitgeteilten Beobachtungen liegt in der aus ihnen hervorgehenden Feststellung, daß im Blute des hyperglykämischen, nicht azidotischen Diabetikers der Ca-Spiegel durch Zufuhr von NaHCO₃ vorübergehend gesenkt werden kann, während dies beim normalen nicht gelingt.

Der Schwefelsäuregehalt des Diabetikerblutes erfährt gleichzeitig, zum Teil nach vorübergehender Zunahme, eine deutliche Abnahme. Über die Beeinflußbarkeit des H₂SO₄-Gehalts des normalen Blutes läßt sich noch nichts Näheres aussagen, da die Versuche noch zu wenig zahlreich sind. Ungeklärt ist auch der starke Schwefelsäureanstieg bei Fall 9.

In welcher Beziehung diese Ergebnisse zu der Pathogenese des Diabetes mellitus stehen, müssen weitere, noch nicht abgeschlossene Untersuchungen zeigen.

Hämolyseversuche in Alkali- und Erdalkalisalzen unter normalen und pathologischen Bedingungen.

Von
Kurt Beckmann.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 2. November 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Nach *Hamburger* steht der Austritt des Hämoglobins aus dem roten Blutkörperchen in einer direkten Abhängigkeit von dem osmotischen Druck der umgebenden Salzlösung.

Er fand bekanntlich, daß die erste Rotfärbung in den verschiedensten Salzlösungen bei der gleichen molaren Konzentration auftritt. Die Untersuchungen *Höbers*¹⁾ ergaben im Gegensatz dazu, daß bei nur geringem Grade der Hypotonie sich bei den Alkalisalzen gesetzmäßige Verschiedenheiten in der Wirkung sowohl der Kationen wie Anionen auf den Grad und Verlauf der Hämolyse nachweisen lassen, die unabhängig von der molaren Konzentration sind. Die hierbei in der Wirkung auf die Hämolyse aufgedeckte Reihenfolge der Kationen und Anionen erwies sich in der Folgezeit zum mindesten insoweit von Bedeutung für die Physiologie, als dieselben Reihen auch bei zahlreichen anderen physiologischen Vorgängen eine Rolle spielen. Ihre Übereinstimmung mit Beobachtungen über ähnliche Wirkungen auf die hydrophilen Kolloide, auf die Fällbarkeit von Eiweißlösungen usw. schienen in die physikalisch-chemischen Strukturverhältnisse in mancher Beziehung Einblick zu gewähren.

Während nun die Salzempfindlichkeit der Erythrocyten von Mensch und Tieren unter der Einwirkung von Blutgiften im Reagenzglas von den verschiedensten Autoren [*Miculicich*²⁾, *Port*³⁾ u. a.] untersucht wurde, fehlen Untersuchungen in dieser Richtung bei krankhaften Veränderungen, speziell bei Blutkrankheiten bis jetzt noch so gut wie völlig. In der Annahme, durch Krankheiten hervorgerufene physikalisch-chemische Zustandsänderungen der Erythrocyten durch die Salzempfindlichkeit nachweisen zu können, habe ich bei zahlreichen Erkrankungen, in erster Linie den ausgesprochenen Blutkrankheiten, die Wirkung der Kationen und Anionen von Alkali- und Erdalkalisalzen geprüft.

¹⁾ *Höber*, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe. 1914.

²⁾ *Miculicich*, Zentralbl. f. Physiol. 24, 523. 1910.

³⁾ *Port*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 99, 259, 1910.

Gewissermaßen als Vorarbeit hierzu bedurfte die Frage einer Klärung, inwieweit die Gegensätze zwischen den Angaben *Hamburgers* von der äquimolaren Wirkung isotonischer Salzlösungen und den Befunden *Höbers* bei nur gering hypotonischen Salzlösungen tatsächlich vorhanden sind. Zu diesem Zwecke untersuchte ich die gesamte Resistenzbreite unter quantitativer Bestimmung der Hämolyse in den verschiedensten Alkali- und Erdalkalisalzen.

Methodik.

Es wurden untersucht: NaCl, KCl, LiCl, RbCl, CsCl, BaCl₂, SrCl₂, CaCl₂, MgCl₂, einerseits, KCl, K₂SO₄, KBr, KJ, KNO₃, KCNS andererseits. Durch Gefrierpunktsbestimmungen wurden von sämtlichen Salzen genau isotonische Stammlösungen hergestellt. Den Ausgangspunkt bildete eine 1,002proz. NaCl-Lösung mit einem Gefrierpunkt von $-0,6200^{\circ}$. Die Abweichungen der übrigen Lösungen von diesem Δ betrugen höchstens $\pm 0,0025^{\circ}$. Von diesen Stammlösungen ausgehend, wurden bei allen Kationen und Anionen die entsprechenden Verdünnungen hergestellt. Der Abstand zwischen den einzelnen Verdünnungen betrug, wie üblich, bei NaCl 0,02 %, bei den übrigen Salzen die äquivalente Menge, so daß auch die Gefrierpunktserniedrigungen bei den einzelnen Verdünnungen übereinstimmten. In den Kurven und Tabellen sind der Einfachheit und Übersicht halber die sämtlichen Lösungen auf Prozente NaCl bezogen.

3 ccm der entsprechenden Verdünnung wurden in Zentrifugenröhrchen gegeben, die, dem *Hamburgerschen* Hämatokriten ähnlich, nach unten kapillar verjüngt ausliefen und den Vorteil gaben, daß die totale Hämolyse schon makroskopisch einwandfrei abgelesen werden konnte. Nach Waschen der Erythrocyten mit isotonischer NaCl-Lösung oder in einigen Fällen mit isotonischer Na₂SO₄-Lösung nach dem Vorschlag *Hamburgers*¹⁾ wurden von dem Blutkörperchenbrei mit Hämoglobinpipetten genau abgemessene Mengen (je nach der Konzentration drei- bis fünfmal 20 cmm) zugegeben. Gleichzeitig wurde eine Kontrolllösung mit Aqua destillata in demselben Verhältnis hergestellt. Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert und dann durch Kolorimetrie des Hb-Gehalts der überstehenden Flüssigkeit im *Autenriethschen* Apparat (Kontrolllösung = 100 %) der Prozentgehalt der hämolysierten Erythrocyten bei den verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt [*Brieger*²⁾]. Dadurch ließ sich direkt quantitativ der Verlauf der Resistenzbreite ermitteln.

Wie aus Tabelle I und II hervorgeht, findet sich nun keineswegs Übereinstimmung der Hämolyse in den unter sich isotonischen Lösungen auch bei dieser Art der Versuchsanordnung. Es läßt sich auch hier eine deutliche Reihenfolge in der Stärke der Hämolyse innerhalb der verschiedenen zur Beobachtung gekommenen Anionen und Kationen erkennen, die unabhängig von der molaren Konzentration ist. Ein Bild über den genauen Verlauf der Hämolyse ergibt sich aus Abb. 1 und 2 für Kationen und Anionen. In diesen sind Hämolysekurven aus

¹⁾ *Hamburger*, diese Zeitschr. 129, 163, 1922.

²⁾ *Brieger*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 188, 397, 1920.

Tabelle I. Kationen.

Nr.	1	2	3	4	5	6
NaCl	0,32—0,44	0,34—0,44	0,36—0,46	0,34—0,44	0,36—0,44	0,36—0,44
KCl	0,38—0,52	0,38—0,52	0,42—0,52	—	0,38—0,48	0,40—0,48
LiCl	0,34—0,46	0,38—0,50	0,38—0,48	—	—	—
RbCl	—	0,36—0,48	—	—	0,38—0,46	—
CsCl	—	—	—	0,34—0,40	0,34—0,44	—
BaCl ₂	—	—	0,32—0,40	—	—	—
SrCl ₂	—	—	—	0,30—0,40	—	—
CaCl ₂	—	—	—	0,32—0,42	—	—
MgCl ₂	—	—	—	0,28—0,42	—	—

Nr.	7	8	9	10	11
NaCl	0,36—0,46	0,36—0,48	0,36—0,44	0,38—0,48	0,34—0,44
KCl	—	—	0,40—0,50	—	0,38—0,48
LiCl	—	0,38—0,50	—	—	—
RbCl	—	0,40—0,50	0,42—0,52	—	—
CsCl	—	—	0,32—0,42	—	—
BaCl ₂	0,32—0,42	—	—	—	—
SrCl ₂	0,30—0,42	—	—	0,34—0,44	—
CaCl ₂	0,36—0,46	—	—	0,38—0,48	0,38—0,48
MgCl ₂	—	0,30—0,42	—	—	—

verschiedenen Bestimmungen zusammengestellt, da es nicht möglich war, sämtliche Kationen und Anionen bei derselben Blutprobe durchzuprüfen. Es sind jedoch möglichst solche Versuche in den Abbildungen

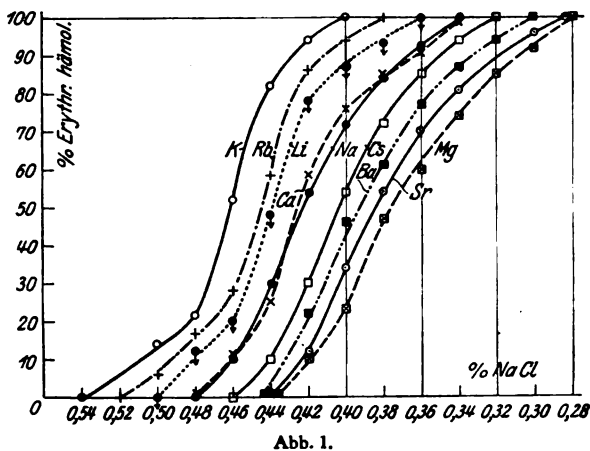


Abb. 1.

verwendet, bei denen dieselbe Grundresistenz für NaCl bestand. Aus Abb. 1 geht in Übereinstimmung mit Tabelle I für die Kationen folgende Reihe hervor:

Mg, Sr (<) Ba < Cs < Ca, Na < Li < Rb < K.

Tabelle II. Anionen.

Nr.	1	2	3
KCl	0,38—0,48	0,42—0,50	0,38—0,48
KBr	0,40—0,50	—	0,38—0,46
KJ	0,42—0,54	—	0,38—0,48
K ₂ SO ₄	0,28—0,36	0,26—0,38	—
KNO ₃	—	0,40—0,48	0,36—0,46
KCN ₈	—	0,40—0,52	0,40—0,52

Maximale und minimale Resistenz stimmen fast völlig überein. Der Verlauf der Hämolysekurven zeigt bei Cs, Ba, Sr und Mg einen weniger steilen Abfall und eine etwas größere Resistenzbreite, als bei den übrigen Kationen, ein Befund, der bei allen Versuchen in gleicher Weise hervortrat.

Die untersuchten Anionen reihen sich folgendermaßen:



Der Abstand der Hämolysekurven von SO₄, in geringerem Maße auch NO₃ von den übrigen Kurven ist in Abb. 2 besonders deutlich.

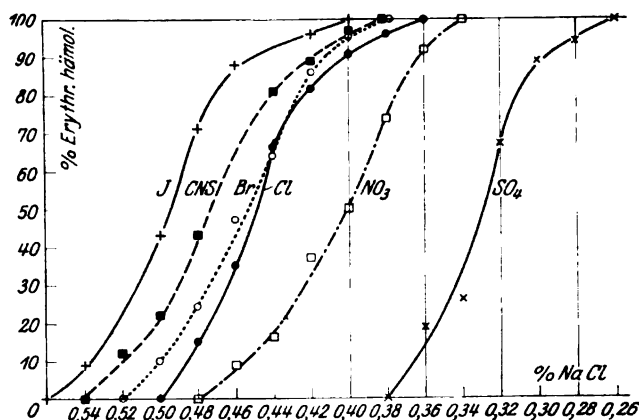


Abb. 2.

Außerdem wurden normale Erythrocyten auch in der Höberschen Anordnung mit schwach hypotonischen Salzlösungen untersucht. Auch hierbei wurden genau bestimmte Mengen von Blutkörperchen zugegeben und der Grad der Hämolyse durch Kolorimetrie kontrolliert. Auf diese Weise ließen sich auch kleine Differenzen sicherer nachweisen, als mit der rein abschätzenden Methode nach drei Farbgraden. Außerdem wurden nie mehr als 0,7 proz. Kochsalzlösungen verwendet (bei den übrigen Salzlösungen äquimolare Lösungen). Dies geschah hauptsächlich aus dem Grunde, um rascher zu konstanten Werten zu gelangen.

Tabelle III.

	Erythr. hämolyisiert %		Erythr. hämolyisiert %		Erythr. hämolyisiert %
Na	20	Ba	4	Cl	67
K	67	Sr	0	J	100
Li	25	Ca	4	Br	47
Rb	54	Mg	0	SO ₄	0
Cs	12			NO ₃	34
				CNS	85

Reihe: $\text{Cs} < \text{Na} < \text{Li} < \text{Rb} < \text{K}$

$\text{Mg}, \text{Sr} < \text{Ba}, \text{Ca}$

$\text{SO}_4 < \text{NO}_3 < \text{Br} < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{J}$.

Es zeigte sich nämlich, daß bei zu langer Dauer der Versuche bakterielle Verunreinigungen und Fäulnisvorgänge, die sich nicht vermeiden ließen, eine Störung von wesentlicher Bedeutung verursachen. Während z. B. *Chassin*¹⁾ angibt, daß bei seiner Anordnung das Endresultat oft erst nach etwa 10 Tagen abzulesen war, ergab sich, daß bei 0,7proz. Lösungen nach spätestens 40 Stunden völlige Konstanz eingetreten war. Bei zahlreichen Versuchen wurde die Hämolyse darüber hinaus bis etwa 120 Stunden beobachtet, ohne daß ein qualitativer Unterschied der Kationen- und Anionenreihe mehr nachweisbar war. Ein Beispiel eines derartigen Versuches nach 40 Stunden ist in Tabelle III wieder gegeben.

Aus allen Normalversuchen ging folgende Reihenfolge hervor:

Kationen: $\text{Cs} \diamond \text{Na} \diamond \text{Li} \diamond \text{Rb} < \text{K}$

$\text{Mg}, \text{Sr} < \text{Ba} < \text{Ca}$

Anionen: $\text{SO}_4 < \text{NO}_3 < \text{Br} \diamond \text{Cl} \diamond \text{CNS} < \text{J}$.

Diese Reihe fand sich bei 20 Normalen mit typischer Regelmäßigkeit. Abweichungen geringen Grades fanden sich nur hier und da zwischen je zwei benachbarten Kationen oder Anionen, die mit $\diamond$ bezeichnet sind. Bei Waschen der Erythrocyten mit isotonischer Na_2SO_4 -Lösung (*Hamburger*) wurde keine Änderung der Reihenfolge beobachtet.

Aus diesen Versuchen geht mit Eindeutigkeit hervor, daß auch bei genauer Verfolgung der Hämolyse über die ganze Resistenzbreite in den verschiedenen Salzlösungen dieselbe Reihenfolge zu beobachten ist, wie bei der *Höberschen* Anordnung mit schwach hypotonischen Lösungen. Es spielt also demnach nicht die Isotonie die Hauptrolle, sondern die spezifische Wirksamkeit der Anionen und Kationen.

Nachdem auf diese Weise eine breite Grundlage beim Normalen geschaffen war, wurden die Erythrocyten bei krankhaften Zuständen in derselben Weise untersucht.

¹⁾ *Chassin*, Dissertation Zürich 1910.

Höber und *Nast*¹⁾ sprachen schon die Vermutung aus, daß in Fällen einer pathologisch veränderten Blutkörperchenresistenz eine abnorme Salzmischung in den entarteten Blutkörperchen in Betracht kommen könne, die sich auf derartige physikalisch-chemische Weise nachweisen lassen müßte. Aus den früher besprochenen Gründen war es nicht möglich, die Resistenz bei einer Blutentnahme durch sämtliche Kationen und Anionen zu prüfen. Es wurde daher im allgemeinen zunächst die Reihenfolge in 0,7proz. Lösungen verfolgt und Auffälligkeiten dann im einzelnen durch genaue Resistenzprüfungen kontrolliert.

Die stärksten Veränderungen der Resistenz sind beim hämolytischen Ikterus bekannt. Es schien danach möglich, daß die Verminderung der NaCl-Resistenz beim hämolytischen Ikterus auf einer Änderung der Salzempfindlichkeit und der Reihenfolge der Kationen und Anionen beruhen könne. *Rosenthal*²⁾ hat diese Frage schon bezüglich der Anionen untersucht. Er fand hierbei keinen Unterschied in der Reihenfolge zwischen den resistenstesten normalen menschlichen Blutkörperchen und denen des hämolytischen Ikterus bei Prüfung der maximalen Resistenz. Dagegen fand er bei Prüfung der minimalen Resistenz eine teilweise Umkehrung der Reihe. Normalerweise fand er die Reihe: $\text{NO}_3, \text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{J} < \text{SCN}, \text{Br}$, beim hämolytischen Ikterus die Reihe $\text{NO}_3 < \text{SO}_4 < \text{SCN}, \text{Br} < \text{Cl} < \text{J}$. Seine Normalreihe unterscheidet sich von der in meinen Normalfällen gefundenen durch die Stellung von J, was vielleicht durch die von *Rosenthal* offenbar nicht ausgeführte Kontrolle der Lösungen durch die Gefrierpunktbestimmung erklärt werden kann. *Rosenthal* zog aus diesen Abweichungen den Schluß, daß bei dem von ihm untersuchten Falle von hämolytischem Ikterus nur die hydrophilen Kolloide der osmotisch schwächsten Erythrocyten eine von der Norm abweichende physikalische Struktur besitzen.

Unter den von mir untersuchten Fällen (Tabelle IV) befanden sich ein erworbener und zwei familiäre Formen von hämolytischem Ikterus. Bei diesen ließ sich bei Anwendung der *Höberschen* Anordnung in der Reihenfolge der Anionen keinerlei Abweichung feststellen. Da dabei die Gesamtheit der Erythrocyten die ausschlaggebende Rolle spielt und sich der Einfluß der minimalen Resistenz verwischt, steht dies in Übereinstimmung mit den Befunden *Rosenthals*. Ganz anders fielen jedoch die Beobachtungen bei den von *Rosenthal* nicht untersuchten Kationen aus. Faßt man nur die Alkaliionen ins Auge, so zeigt sich eine auffallende Konstanz zwischen den beiden familiären Fällen. Die Reihenfolge ist gegen die Norm nahezu völlig umgekehrt. K und Rb wirken geringer hämolysierend, Cs und Li stärker. Bei der erworbenen Form ist nur die Stellung von Rb verändert, im übrigen aber die Reihe wie beim Normalen. Ob dieser Unterschied im Sinne der in letzter Zeit mehrfach

¹⁾ *Höber* und *Nast*, diese Zeitschr. 60, 131, 1914.

²⁾ *Rosenthal*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 182, 129, 1920.

betonten prinzipiellen Verschiedenheit zwischen den beiden Krankheitsgruppen überhaupt verwertet werden kann, muß in Anbetracht der geringen Zahl von Fällen unentschieden bleiben. Auffallend ist ferner

Tabelle IV.

Kationen	Anionen
Hämolytischer Ikterus:	
I. Familiäre Form.	
1. $\text{Sr} < \text{Mg} < \text{Ba}$ $\text{Rb} < \text{K}$, $\text{Na} < \text{Cs}$ Li Ca	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3$, $\text{Br} < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{J}$
2. Ca , Sr , $\text{Ba} < \text{Mg}$ $\text{Rb} < \text{K}$, $\text{Na} < \text{Cs} < \text{Li}$	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3$, $\text{Br} < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{J}$
II. Erworbene Form.	
1. $\text{Cs} < \text{Rb}$ $\text{Na} < \text{Li}$ K Ba , $\text{Sr} < \text{Mg}$ Ca	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3 < \text{Br} < \text{CNS} < \text{Cl}$, J
Perniciöse Anämie:	
I. Mit Glossitis.	
1. $\text{Sr} < \text{Ba}$ Na , $\text{K} < \text{Li} < \text{Rb} < \text{Cs}$ $\text{Ca} < \text{Mg}$	$\text{Cl} < \text{NO}_3 < \text{CNS} < \text{SO}_4 < \text{J} < \text{Br}$ $\text{NO}_3 < \text{Cl}$, $\text{SO}_4 < \text{Br}$, CNS , J
2. $\text{Li} < \text{Na} < \text{Cs}$, Rb , K $\text{Mg} < \text{Ba} < \text{Sr} < \text{Ca}$	$\text{SO}_4 < \text{Br} < \text{NO}_3 < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{J}$
3. Li $\text{Rb} < \text{Cs}$ Na , K Mg Ba , Sr Ca	$\text{SO}_4 < \text{Br} < \text{NO}_3 < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{J}$
II. Ohne Glossitis.	
4. Li K , Na , Ba , Sr $\text{Rb} < \text{Cs}$ Mg Ca	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3$, $\text{Cl} < \text{Br} < \text{CNS} < \text{J}$
5. Li , Mg Rb , Cs $\text{K} < \text{Na}$ Sr Ca , Ba	$\text{Br} < \text{NO}_3 < \text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{J}$
6. Li , $\text{Rb} < \text{Na}$, K Cs Sr , $\text{Ba} < \text{Ca}$	SO_4 , Cl , $\text{Br} < \text{NO}_3 < \text{J} < \text{CNS}$
Chlorose:	
1. $\text{Ba} < \text{Mg} < \text{Sr}$, Cs Na , $\text{Li} < \text{K}$, Rb Ca	$\text{SO}_4 < \text{Br} < \text{Cl} < \text{J}$
2. Rb , $\text{Li} < \text{Cs} < \text{K} < \text{Na}$, $\text{Sr} < \text{Ca} < \text{Ba}$	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3 < \text{Cl} < \text{Br} < \text{CNS} < \text{J}$
Ikterus:	
1. Ba , Sr , Mg $\text{Li} < \text{Na}$ $\text{Cs} < \text{K} < \text{Rb}$ Ca	$\text{SO}_4 < \text{Br} < \text{Cl} < \text{J}$
Pseudobanti:	
1. Mg , Ba Li $\text{Ca} < \text{Sr}$ $\text{Na} < \text{Cs} < \text{Rb} < \text{K}$	CNS , $\text{NO}_3 < \text{SO}_4 < \text{Br} < \text{Cl} < \text{J}$
Urämie:	
1. Ba , Sr , Ca , Mg $\text{Na} < \text{Li} < \text{Cs} < \text{Rb} < \text{K}$	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3 < \text{CNS} < \text{Br} < \text{Cl} < \text{J}$
2. $\text{Mg} < \text{Sr}$, Rb , $\text{Li} < \text{Na}$, Cs K $\text{Ca} < \text{Ba}$	$\text{SO}_4 < \text{Br} < \text{Cl}$, $\text{NO}_3 < \text{CNS}$, J

bei dem zweiten der familiären Fälle die geringe hämolysierende Wirkung von Ca gegenüber den beiden anderen, bei denen Ca an zweitletzter Stelle steht. Auch die teilweise ausgeführte Prüfung der gesamten Resistenzbreite ergab die Bestätigung dieser mit der Höberschen Anordnung gefundenen Reihenfolge. Bei den Kationen ließ sich dabei kein Unterschied zwischen minimaler und maximaler Resistenz nachweisen.

Während zwar bei der perniziösen Anämie die Resistenz der Erythrocyten gegen NaCl meist nicht erheblich verändert ist, ließen sich doch bei dieser Krankheit am ehesten ausgesprochene Strukturänderungen der Erythrocyten erwarten. Im ganzen wurden sechs Fälle untersucht, die in Tabelle IV nach *Hunter*¹⁾ in zwei Gruppen eingeteilt sind: in Fälle mit Glossitis, *Hunters* echte perniziöse Anämie, und in Fälle ohne Glossitis, von *Hunter* als kryptogenetisch-septische Anämie aufgefaßt. Nach Tabelle IV findet sich hier bei drei Fällen, was die Anionen anbelangt, eine auffällige Stellung des SO_4 -Ions. Während dieses in allen untersuchten Fällen bis auf eine später zu besprechende Ausnahme an erster Stelle steht, also die geringste hämolysierende Wirkung ausübt, ist es in diesen bis zur Mitte der Reihe gerückt. Statt dessen steht Cl, NO_3 , in einem Falle sogar Br an seiner Stelle.

Stärker sind auch hier wieder die Abweichungen bei den Kationen ausgeprägt. Aus der zunächst regellos geändert erscheinenden Reihenfolge läßt sich jedoch zweierlei als charakteristisch herauschälen. Einmal die besonders in Fall 2 ausgeprägte, aber auch bei allen anderen Fällen nachweisbare Umkehrung der Wirkung der Alkalien gegenüber den Erdalkalien. Die letzteren hämolysieren wesentlich stärker, als bisher beobachtet, vor allem Ba und Ca. Zeigt doch z. B. in Fall 1 Mg die stärkste Hämolysen, während es bei den Normalfällen die geringste aufwies. Zweitens fällt in fünf von den sechs Fällen die überragende Stellung des Li-Ions auf, das am schwächsten hämolysiert. Dies ist um so bemerkenswerter, als bei den Fällen von familiärem hämolytischem Ikterus, der im allgemeinen doch ein der perniziösen Anämie morphologisch weitgehend ähnliches rotes Blutbild aufweist, gerade das Li-Ion am stärksten hämolysiert und am Ende der ganzen Reihe steht. Sollte sich dieses Verhalten auch bei weiterer Prüfung an größerem Material bestätigen, so wäre damit ein weiteres Unterscheidungsmerkmal bei klinisch differentialdiagnostisch schwierigen Fällen gegeben. Allerdings zeigt schon Fall 1 in Tabelle IV, daß die Li-Wirkung nicht immer so stark ausgeprägt ist.

Die beiden Fälle von echter Chlorose, die untersucht wurden, zeigen untereinander sehr wenig Übereinstimmung. Der zweite Fall zeigt

¹⁾*Hunter*, Brit. med. journ. Nr. 3194, 1922; zitiert nach Kongr. 130, 1922.

ebenfalls ein Überwiegen der Erdalkalien gegenüber den Alkalien und eine auffällig geringe hämolytische Wirkung von Rb gegenüber der Norm. Der erste Fall weicht nur geringfügig von den Normalfällen ab. Die Anionenreihe ist nicht verändert. Es läßt sich danach, schon bei der geringen Anzahl von Fällen, nichts für Chlorose Charakteristisches aussagen.

Bei sekundären Anämien ließ sich im Gegensatz zu den bisherigen Befunden keine Abweichung von der Norm feststellen. Ebenso nicht bei vier schweren Karzinomanämien. Daraus geht hervor, daß in klinisch zweifelhaften Fällen die Unterscheidung zwischen schweren sekundären und hämolytischen Anämien durch Bestimmung der Anionen- und vor allem Kationenreihenfolge möglich sein dürfte.

Resistenzveränderungen in umgekehrter Richtung als beim hämolytischen Ikterus sind bei starkem Ikterus mit Vermehrung der Gallensäuren im Blute bekannt. Ein Fall von katarrhalischem Ikterus mit Bradykardie, Hautjucken und allerdings nur leicht vermehrter Resistenz zeigte nichts Auffälliges.

Bei einem Falle von luetischem Pseudobanti mit starkem Milztumor und mäßig starker Anämie fanden sich in der Kationenreihe nur geringfügige Umstellungen einzelner weniger Ionen, die keine weiteren Schlüsse erlauben. Dagegen besteht in der Anionenreihe, ähnlich wie bei den Fällen von perniziöser Anämie, eine auffällige Stellung des SO_4 -Ions. An seine Stelle sind CNS und NO_3 gerückt. Aus folgenden Gründen ist dabei vielleicht an eine Einwirkung der Milz zu denken. Die Milzfunktion steht nach allem, was wir wissen, in einer wohl nicht abzulehnenden Beziehung zu Veränderungen der Erythrocytenresistenz. In diesem Sinne sprechen die Erfolge der Milzexstirpation beim erworbenen hämolytischen Ikterus und die nach Milzexstirpation auftretende Resistenzvermehrung [Pel¹⁾]. Es erhob sich die Frage, ob diese Resistenzvermehrung ebenfalls auf einer Änderung der Salzempfindlichkeit beruhe. Hierauf gerichtete Versuche an milzexstirpierten Kaninchen bestätigten dies in der Tat. Bei einem Kaninchen, dessen Resistenz von 0,40 bis 0,56 % NaCl 2 Monate nach der Milzexstirpation auf 0,36 bis 0,50 vermehrt war, änderte sich die Hämolysereihe folgendermaßen:

Kationen:

vorher:	$\text{K} < \text{Cs}$	$\text{Na} < \text{Rb} < \text{Li}$
	Mg	$\text{Sr} < \text{Ba} < \text{Ca}$
2 Mon. nachher:	Na	$\text{Cs} < \text{Rb} < \text{Li} < \text{K}$
	$\text{Ba} < \text{Mg}$	$\text{Sr} < \text{Ca}$

Anionen:

vorher:	$\text{SO}_4 < \text{Cl} < \text{CNS} < \text{NO}_3 < \text{Br} < \text{J}$
2 Monate nachher:	$\text{SO}_4 < \text{NO}_3 < \text{CNS} < \text{Cl} < \text{J} < \text{Br}$

¹⁾ Pel, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 106, 592, 1912.

Die vermehrte Resistenz der Erythrocyten gegen NaCl erklärt sich danach einfach durch die veränderte Stellung des Na-Ions innerhalb der Reihe. Bei einem zweiten jüngeren Tiere konnten 6 Monate nach der Milzexstirpation ebenfalls Änderungen der Reihenfolge, wenn auch nicht der genau gleichen Art beobachtet werden.

Es erscheint danach möglich, eine der Ursachen dieser Änderungen der Salzempfindlichkeit der Erythrocyten analog diesen tiereperimentellen Befunden in Störungen der mit dem hämatopoetischen Apparat in Zusammenhang stehenden Organe zu suchen. Welche andere Organe außer der Milz in dieser Beziehung noch in Betracht kommen, bedarf erst noch weiterer Untersuchungen.

Aber auch damit wäre noch keine endgültige Klärung erreicht. Auf welchem Wege die Veränderung auch zustande kommen mag, letzten Endes ist sie doch nur durch die Zustandsänderung der Erythrocyten selbst bedingt. Aus den Beobachtungen geht hervor, daß nur bei ganz gewissen Gruppen von Erkrankungen des Blutes derartige Veränderungen auftreten. Selbst schwere Anämien sekundärer Art weichen nicht von dem Normalen ab. Selbst rein morphologisch so fast identische Blutbilder, wie bei der perniziösen Anämie und dem hämolytischen Ikterus zeigen dagegen auffallende und bis zu einem gewissen Grade typische Unterschiede.

Höber und *Nast*¹⁾ denken an einen Einfluß der Binnensalze der Erythrocyten, da sich bei den verschiedenen Tierarten sowohl nach den Hämolysereihen, wie nach den Untersuchungen *Abderhaldens*²⁾ über den Phosphorsäure-, Kalium- und Natriumgehalt der Erythrocyten gleichartige Gruppen unterscheiden lassen. Ähnliche Untersuchungen, wie die *Abderhaldens*, fehlen bei Bluterkrankungen bis jetzt vollständig. Auch der indirekte Weg, durch Vergleich der Hämolysereihen bei Krankheiten mit den Hämolysereihen von Tierarten, deren Erythrocyten von *Abderhalden* analysiert sind, Schlüsse auf veränderten Salzgehalt der pathologischen Erythrocyten zu ziehen, schlug fehl. Es fand sich keinerlei Übereinstimmung mit irgend einer der Hämolysereihen von zehn verschiedenen Tierarten, die aus anderen Überlegungen heraus untersucht wurden. Obwohl damit an sich noch nichts bewiesen ist, muß doch die Frage der Bedeutung der Binnensalze auf die erwähnten Veränderungen so lange zurückgestellt werden, bis direkte Analysen darüber vorliegen.

Ein Moment, das in der reinen Kolloidchemie als besonders bedeutungsvoll in dieser Beziehung in den Vordergrund tritt, ist die elektrische Ladung der Kolloide. Ein geringer Zusatz von Lauge oder Säure kann die Reihenfolge der Wirksamkeit der Salzionen auf Kolloide von Grund aus ändern. Nach *Höber*³⁾ verläuft die Wirkung der Alkalionen auf die Fällbarkeit von Hühnereiweiß in der Reihenfolge:

¹⁾ l. c.

²⁾ *Abderhalden*, Lehrb. der physiol. Chem., 2. Aufl.

³⁾ *Höber*, Beitr. z. chem. Physiol. 11, 35, 1907.

Cs < Rb < K < Na < Li bei saurer Reaktion, in der Reihenfolge: Li < Na < K < Rb < Cs bei alkalischer. Bei neutraler oder nahezu neutraler Reaktion, wie sie normalerweise von den Körpersäften innegehalten wird, treten sogenannte Übergangsreihen auf, wie sie z. B. die normale Hämolysereihe auch darstellt.

Bestehen nun bei den untersuchten Krankheiten Änderungen der Reaktion des Blutes, die Schlüsse in dieser Richtung erlauben?

Die Angaben in der Literatur über Änderungen der Reaktion bei Blutkrankheiten sind verhältnismäßig spärlich. *Barr und Peters*¹⁾ fanden bei drei Fällen schwerer Blutarmut die H-Ionenkonzentration des arteriellen Blutes niedrig, die des venösen lag zwischen 7,32 und 7,38. Nach *Evans*²⁾ wird im Tierversuch bei sekundärer Anämie nach Blutung die Abnahme der Alkalireserve rasch durch gesteigerte renale Säureausfuhr kompensiert und dadurch die Änderung der Reaktion verhindert. *Means, Bock und Woodwell*³⁾ fanden bei zwei perniziösen Anämien die Reaktion nach der alkalischen Seite verschoben. Auch bei einem der von mir untersuchten Fälle von perniziöser Anämie (Nr. 6 in Tabelle IV) wurde die Reaktion des arteriellen Blutes bestimmt⁴⁾. p_H betrug 7,49, war also deutlich alkalischer als normal. Vergleicht man gerade bei diesem Falle die Reihe der Alkaliionen mit der oben angeführten *Höbers* bei der Wirkung auf Hühner-eiweiß, so fällt vor allem die Übereinstimmung der beiden in Endstellung stehenden Ionen Li und Cs auf. Sollte sich die Beobachtung der amerikanischen Autoren noch weiter bestätigen und die perniziöse Anämie konstant mit einer Neigung zu alkalischer Reaktion einhergehen, so ließe sich in der Tat dadurch das gegen die Norm so auffällige Verhalten des Li-Ions mit großer Wahrscheinlichkeit erklären.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend, wurde weiterhin in zwei Fällen von Urämie mit deutlicher Vermehrung der Wasserstoffionenkonzentration im Blute die Anionen- und Kationenreihe verfolgt (Tabelle IV). Bei dem ersten Falle betrug p_H im Blute 7,30, bei dem zweiten 7,27. Bei beiden stimmt die Reihe nicht völlig mit der des Normalen überein. Es bleibt jedoch der größte Teil in derselben Richtung erhalten. Eine Übereinstimmung mit den Befunden an Hühnereiweiß bei saurer Reaktion ist nicht zu erkennen. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß die Reaktion nur in verhältnismäßig sehr geringem Maße nach der saureren Seite verschoben und noch weit entfernt von der dort in Anwendung gekommenen Azidität ist. Immerhin ist es auffällig, daß selbst hier Veränderungen zu beobachten sind, wo morphologisch sich die Erythrocyten in nichts von normalen unterscheiden.

Diese Beobachtungen lassen danach doch den Schluß zu, daß die Änderungen der Wirkung der Salzionen in einer in ihren Einzelheiten

¹⁾ *Barr und Peters*, Journ. of biol. chem. 45, 571, 1921.

²⁾ *Evans*, Brit. journ. of exper. path. 2, 105, 1921; zitiert nach Kongr.-Zentralbl. f. inn. Med. 21, 425, 1922.

³⁾ *Means, Bock und Woodwell*, Journ. of exper. med. 83, 201, 1921.

⁴⁾ Die Bestimmung verdanke ich Fr. Dr. *Kl. Meier*.

noch nicht genau definierbaren Weise eine Funktion der Blutkörperchenladung sind. Ob diese durch Änderung der Hämoglobinadsorption, die durch *Bürkers*¹⁾ neues Oberflächengesetz der Hämoglobinverteilung bei den verschiedenartigsten Erythrocyten in den Vordergrund gerückt ist, oder der Stromasubstanzen [*Jodlbauer* und *Haffner*²⁾] bedingt ist, darüber läßt sich in Beziehung auf die pathologischen Erythrocyten zurzeit noch nichts Eindeutiges aussagen.

Zusammenfassung.

Sowohl bei direkter Verfolgung der gesamten Resistenzbreite wie bei Untersuchung der Hämolyse in schwach hypotonischen Lösungen von Erdalkali- und Alkalisalzen in der Anordnung von *Höber* findet sich bezüglich der Anionen und Kationen dieselbe typische Reihenfolge der Hämolyse von folgender Art:

Kationen: Cs $\diamond$ Na $\diamond$ Li $\diamond$ Rb < K
Mg, Sr < Ba < Ca

Anionen: SO₄ < NO₃ < Br $\diamond$ Cl $\diamond$ CNS < J.

Es spielen also nicht osmotische Einflüsse, sondern die spezifische Wirkung der verschiedenen Salzionen die Hauptrolle für das Zustandekommen der Hämolyse Reihen.

Bei sekundären Anämien, vier schweren Karzinomanämien und einem Fall von katarrhalischem Ikterus fand sich keine Abweichung von der Norm.

Bei hämolytischem Ikterus und perniziöser Anämie fanden sich dagegen bestimmte und offenbar bis zu einem gewissen Grade für diese Krankheiten charakteristische Änderungen.

Bei einem Falle von Pseudobanti und zwei Fällen von Urämie mit vermehrter H-Ionenkonzentration im Blute fanden sich ebenfalls Abweichungen geringeren Grades.

Es spielt offenbar die Reaktion des Blutes und damit die elektrische Ladung der Blutkörperchen eine Rolle für die Veränderungen der Hämolyse Reihen unter pathologischen Verhältnissen.

¹⁾ *Bürker*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 195, 516, 1922.

²⁾ *Jodlbauer* und *Haffner*, ebendasselbst 179, 121, 1920; *Haffner*, ebendasselbst 186, 15, 1922.

Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins. I.

Von

Kiko Goto aus Japan.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 3. November 1922.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Ausscheidung von Hämatoporphyrin oder dem Hämatoporphyrin ähnlichen Körpern im Harn, die teils nach gewissen Vergiftungen, teils in einer sogenannten kongenitalen Form auftreten, ließen es, da der Nachweis dieser Körper wohl hauptsächlich auf der spektroskopischen Prüfung beruht, als wünschenswert erscheinen, die Angaben über die Lichtabsorption des Hämatoporphyrins in verschiedenen Lösungsmitteln einer Revision zu unterziehen bzw., wenn möglich, durch genauere zu ersetzen. Denn manche der älteren Angaben beziehen sich einfach auf mit konzentrierter Schwefelsäure behandeltes Blut; andere wohl auf Hämatoporphyrin, das jedoch seinerzeit nicht in der Reinheit dargestellt werden konnte, wie dies heute möglich ist.

Zu den hier beschriebenen Untersuchungen wurde Hämatoporphyrin im großen und ganzen so dargestellt, wie dies *Willstätter* und *Fischer*¹⁾ in ihrer Mitteilung beschrieben. Defibriniertes Pferdeblut wurde zentrifugiert, die mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen roten Blutkörperchen im gleichen Volumen Wasser aufgeschwemmt und durch Zusatz von Äther hämolysiert, die Oxyhämoglobininlösung im Scheidetrichter von Äther und Stromaschicht getrennt und durch Durchleiten von Luft vom absorbierten Äther befreit.

In einem Rundkolben von 2 Liter Fassungsraum wurde 1 Liter Eisessig, dem 5 g Kochsalz zugesetzt waren, aufgeköcht, der in schwachem Sieden erhaltenen Flüssigkeit etwa 350 ccm der Oxyhämoglobininlösung durch einen Tropftrichter kleinweise im Verlauf einer halben Stunde hinzugefügt, die Flüssigkeit noch 10 Minuten lang im schwachen Sieden erhalten und sodann im Verlauf von einer Viertelstunde mit 1 Liter Wasser versetzt. Nach 24stündigem Stehen wird die Flüssigkeit mit Wasser auf das Vierfache verdünnt, stehen gelassen, bis sich das Hämin auf dem Boden

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 146.

des Gefäßes angesammelt hatte, die darüber stehende Flüssigkeit mit den darin suspendierten feinen Häminkristallen weggegossen, der Bodensatz auf ein Filter gebracht, abtropfen gelassen, der Niederschlag am Filter mit Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat farblos ablief, mit Alkohol und mit Äther gewaschen und getrocknet.

Aus dem so erhaltenen Häm in wurde Hämatoporphyrin mittels Bromwasserstoffsäure bereitet: in einem Kolben, der auf 8 Tle. roten Phosphors 16 Tle. Wasser enthielt, ließ ich durch einen Tropftrichter allmählich 100 g Brom einfließen und erwärmte, nachdem alles Brom eingetragen war, mit einer untergestellten kleinen Flamme. Die dem Kolben entweichenden Gase wurden, um sie vom verflüchtigten Brom zu befreien, durch ein etwa 50 cm langes Rohr geleitet, das Bimsstein und angefeuchteten roten Phosphor enthielt, und in einer Vorlage aufgefangen, die anfangs mit Wasser, später, als ich nicht mehr befürchten mußte, daß der Eisessig in der Vorlage gefriert, mit einer Kochsalz-Eiswassermischung gekühlt wurde. In der so erhaltenen Bromwasserstoffsäure, die leicht gelblich gefärbt war und bei 0° C ein spezifisches Gewicht von 1,40 hatte, wurden die Häminkristalle bei Zimmertemperatur gelöst. Dies ging wohl nicht so rasch, wie es *Willstätter* und *Fischer* beschrieben, doch erhielt ich nach einige Stunden langem Schütteln eine recht konzentrierte Lösung, die mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt und nach 3 Stunden filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit einer konzentrierten Lösung von essigsaurem Natrium gefällt, der gut ausgewaschene Niederschlag zwischen Filtrierpapier abgepreßt, in 96proz. Alkohol gelöst und in Äther eingegossen.

Nun habe ich nach *Willstätter* und *Fischer* die ätherische Lösung, um sie von Alkohol zu befreien, wiederholt mit Wasser gewaschen und versucht, das Hämatoporphyrin aus der ätherischen Lösung kristallisiert zu erhalten, was jedoch trotz vielfacher daraufhin verwendeter Mühe nicht gelungen ist. Zwei von den vier Präparaten, die den weiter unten zu beschreibenden Versuchen dienten, wurden auf die soeben beschriebene Weise bereitet; bei der Herstellung zweier anderer Präparate bin ich etwas anders vorgegangen (s. weiter unten).

Die so hergestellten Präparate wurden in 96proz. Alkohol gelöst und der spektrophotometrischen Untersuchung in dem von *Hári*¹⁾ seinerzeit verwendeten, nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Apparat unterworfen. Bezüglich der Ausführung dieser Bestimmungen sei bloß so viel bemerkt, daß als Lichtquelle eine starke Metallfadenglühlampe verwendet wurde. Die Breite des Objekтивspaltes betrug konstant 0,1 mm; auch der Okularspalt mußte längs des ganzen Spektrums unverändert eingestellt bleiben, und zwar aus dem Grunde, weil er an diesem Apparat nicht meßbar verstellbar ist. Die Breite des Okularspaltes entsprach in dem gegen Rot gelegenen Spektralgebiete etwa 15, in dem gegen Violett gelegenen etwa 6 μ . Die Ablesungen wurden, namentlich wo es sich um die Feststellung der Maxima der Absorption handelte, in möglichst kleinen, an den übrigen Stellen in größeren Intervallen ausgeführt. Die an je einer Lösung bestimmten Extinktionskoeffizienten wurden auf die einheitliche Konzentration

¹⁾ Diese Zeitschr. 95, 266, 1919.

von 0,1 %, also in sogenannte *spezifische Extinktionskoeffizienten* umgerechnet und sind als solche in der Generaltabelle auf S. 334 bis 339 dieser Mitteilung enthalten. Sie wurden außerdem auch als Ordinaten in ein Ordinatensystem eingetragen, in dem die Wellenlängen auf der Abszissenachse verzeichnet waren, und die Schnittpunkte zu Kurven vereinigt, die im Texte untergebracht sind.

Die alkoholischen Lösungen der verschiedenen Präparate wurden teils ohne jeden weiteren Zusatz, teils nach Alkalisierung mit konzentriertem Ammoniak, teils nach Ansäuerung mit konzentrierter Essigsäure bzw. mit Salzsäure untersucht.

Es kamen alles in allem vier Präparate zur Untersuchung:

Präparat I. Herstellung nach dem oben beschriebenen Verfahren, Konzentrationsbestimmung durch Eindampfen eines bekannten Volumens der alkoholischen Lösung; die Konzentration betrug 0,140 %.

Präparat II. Herstellung und Konzentrationsbestimmung wie an Präparat I; Konzentration der Lösung 0,152 %.

Präparat III. Die Lösung des Hämins in Bromwasserstoffsäure erfolgte nicht wie sonst bei Zimmertemperatur, sondern in einem Wasserbad von 45°C; auf diese Weise entstand bereits nach 15 Minuten langem Schütteln eine recht konzentrierte Lösung; die Konzentration der untersuchten Lösung wurde durch Eindampfen eines bestimmten Volumens bestimmt und ergab sich zu 0,273 %.

Präparat IV stammte von dem bei 45°C erhaltenen Präparat III ab, nur wurde an einem Teile derselben eine Umfällung wie folgt vorgenommen. Der mit Natriumacetat gefällte Farbstoff wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, nachher wieder in 96proz. Alkohol gelöst, in Äther eingegossen, der Alkohol mit Wasser gewaschen, die ätherische Lösung eingedampft, der Rückstand in verdünnter Salzsäure gelöst, mit einer konzentrierten Lösung von Natriumacetat gefällt und weiter wie die übrigen Präparate behandelt.

Beschreibung der Versuche.

A. Hämatoporphyrin in neutraler (rein alkoholischer), in ammoniakalisch alkoholischer und essigsaurer alkoholischer Lösung; unbelichtet (siehe weiter unten). Die alkoholischen Lösungen wurden teils ohne jeden Zusatz, teils nach Zusatz von konzentriertem Ammoniak, 20 zu 100, teils nach Zusatz von konzentrierter Essigsäure, 3 zu 100 untersucht.

Alkoholische Lösungen von Hämatoporphyrin verhalten sich, ob sie ohne jeden weiteren Zusatz oder nach Alkalisierung mit Ammoniak oder aber nach Ansäuerung mit Essigsäure untersucht werden im Spektroskop geprüft, vollkommen gleich: sie zeigen die bekannten vier Absorptionsstreifen. Aber auch bei der spektrophotometrischen Bestimmung ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung, wie aus Abb. 1, 2 und 3 hervorgeht.

des Gefäßes angesammelt hatte, die darüber stehende Flüssigkeit mit den darin suspendierten feinen Häminkristallen weggegossen, der Bodensatz auf ein Filter gebracht, abtropfen gelassen, der Niederschlag am Filter mit Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat farblos ablief, mit Alkohol und mit Äther gewaschen und getrocknet.

Aus dem so erhaltenen Hämin wurde Hämatoporphyrin mittels Bromwasserstoffsäure bereitet: in einem Kolben, der auf 8 Tle. roten Phosphors 16 Tle. Wasser enthielt, ließ ich durch einen Tropftrichter allmählich 100 g Brom einfließen und erwärmte, nachdem alles Brom eingetragen war, mit einer untergestellten kleinen Flamme. Die dem Kolben entweichenden Gase wurden, um sie vom verflüchtigten Brom zu befreien, durch ein etwa 50 cm langes Rohr geleitet, das Bimsstein und angefeuchteten roten Phosphor enthielt, und in einer Vorlage aufzufangen, die anfangs mit Wasser, später, als ich nicht mehr befürchten mußte, daß der Eissieg in der Vorlage gefriert, mit einer Kochsalz-Eiswassermischung gekühlt wurde. In der so erhaltenen Bromwasserstoffsäure, die leicht gelblich gefärbt war und bei 0° C ein spezifisches Gewicht von 1,40 hatte, wurden die Häminkristalle bei Zimmertemperatur gelöst. Dies ging wohl nicht so rasch, wie es *Willstätter* und *Fischer* beschrieben, doch erhielt ich nach einige Stunden langem Schütteln eine recht konzentrierte Lösung, die mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt und nach 3 Stunden filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit einer konzentrierten Lösung von essigsaurem Natrium gefällt, der gut ausgewaschene Niederschlag zwischen Filterpapier abgepreßt, in 96proz. Alkohol gelöst und in Äther eingegossen.

Nun habe ich nach *Willstätter* und *Fischer* die ätherische Lösung, um sie von Alkohol zu befreien, wiederholt mit Wasser gewaschen und versucht, das Hämatoporphyrin aus der ätherischen Lösung kristallisiert zu erhalten, was jedoch trotz vielfacher daraufhin verwendeter Mühe nicht gelungen ist. Zwei von den vier Präparaten, die den weiter unten zu beschreibenden Versuchen dienten, wurden auf die soeben beschriebene Weise bereitet; bei der Herstellung zweier anderer Präparate bin ich etwas anders vorgegangen (s. weiter unten).

Die so hergestellten Präparate wurden in 96proz. Alkohol gelöst und der spektrophotometrischen Untersuchung in dem von *Häri*¹⁾ seinerzeit verwendeten, nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Apparat unterworfen. Bezüglich der Ausführung dieser Bestimmungen sei bloß so viel bemerkt, daß als Lichtquelle eine starke Metallfadenglühlampe verwendet wurde. Die Breite des Objekтивspaltes betrug konstant 0,1 mm; auch der Okularspalt mußte längs des ganzen Spektrums unverändert eingestellt bleiben, und zwar aus dem Grunde, weil er an diesem Apparat nicht meßbar verstellbar ist. Die Breite des Okularspaltes entsprach in dem gegen Rot gelegenen Spektralgebiete etwa 15, in dem gegen Violett gelegenen etwa 6 μ . Die Ablesungen wurden, namentlich wo es sich um die Feststellung der Maxima der Absorption handelte, in möglichst kleinen, an den übrigen Stellen in größeren Intervallen ausgeführt. Die an je einer Lösung bestimmten Extinktionskoeffizienten wurden auf die einheitliche Konzentration

¹⁾ Diese Zeitschr. 95, 266, 1919.

von 0,1 %, also in sogenannte *spezifische Extinktionskoeffizienten* umgerechnet und sind als solche in der Generaltabelle auf S. 334 bis 339 dieser Mitteilung enthalten. Sie wurden außerdem auch als Ordinaten in ein Ordinatensystem eingetragen, in dem die Wellenlängen auf der Abszissenachse verzeichnet waren, und die Schnittpunkte zu Kurven vereinigt, die im Texte untergebracht sind.

Die alkoholischen Lösungen der verschiedenen Präparate wurden teils ohne jeden weiteren Zusatz, teils nach Alkalisierung mit konzentriertem Ammoniak, teils nach Ansäuerung mit konzentrierter Essigsäure bzw. mit Salzsäure untersucht.

Es kamen alles in allem vier Präparate zur Untersuchung:

Präparat I. Herstellung nach dem oben beschriebenen Verfahren, Konzentrationsbestimmung durch Eindampfen eines bekannten Volumens der alkoholischen Lösung; die Konzentration betrug 0,140 %.

Präparat II. Herstellung und Konzentrationsbestimmung wie an Präparat I; Konzentration der Lösung 0,152 %.

Präparat III. Die Lösung des Hämins in Bromwasserstoffsäure erfolgte nicht wie sonst bei Zimmertemperatur, sondern in einem Wasserbad von 45°C; auf diese Weise entstand bereits nach 15 Minuten langem Schütteln eine recht konzentrierte Lösung; die Konzentration der untersuchten Lösung wurde durch Eindampfen eines bestimmten Volumens bestimmt und ergab sich zu 0,273 %.

Präparat IV stammte von dem bei 45°C erhaltenen Präparat III ab, nur wurde an einem Teile derselben eine Umfällung wie folgt vorgenommen. Der mit Natriumacetat gefällte Farbstoff wurde im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, nachher wieder in 96proz. Alkohol gelöst, in Äther eingegossen, der Alkohol mit Wasser gewegewaschen, die ätherische Lösung eingedampft, der Rückstand in verdünnter Salzsäure gelöst, mit einer konzentrierten Lösung von Natriumacetat gefällt und weiter wie die übrigen Präparate behandelt.

Beschreibung der Versuche.

A. Hämatoporphyrin in neutraler (rein alkoholischer), in ammoniakalisch alkoholischer und essigsaurer alkoholischer Lösung; unbelichtet (siehe weiter unten). Die alkoholischen Lösungen wurden teils ohne jeden Zusatz, teils nach Zusatz von konzentriertem Ammoniak, 20 zu 100, teils nach Zusatz von konzentrierter Essigsäure, 3 zu 100 untersucht.

Alkoholische Lösungen von Hämatoporphyrin verhalten sich, ob sie ohne jeden weiteren Zusatz oder nach Alkalisierung mit Ammoniak oder aber nach Ansäuerung mit Essigsäure untersucht werden im Spektroskop geprüft, vollkommen gleich: sie zeigen die bekannten vier Absorptionsstreifen. Aber auch bei der spektrophotometrischen Bestimmung ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung, wie aus Abb. 1, 2 und 3 hervorgeht.

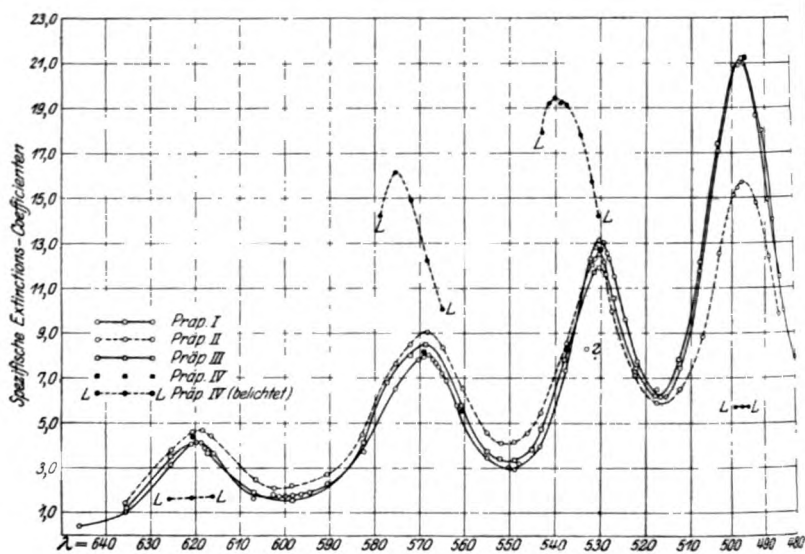


Abb. 1. Neutrale alkoholische Lösung.

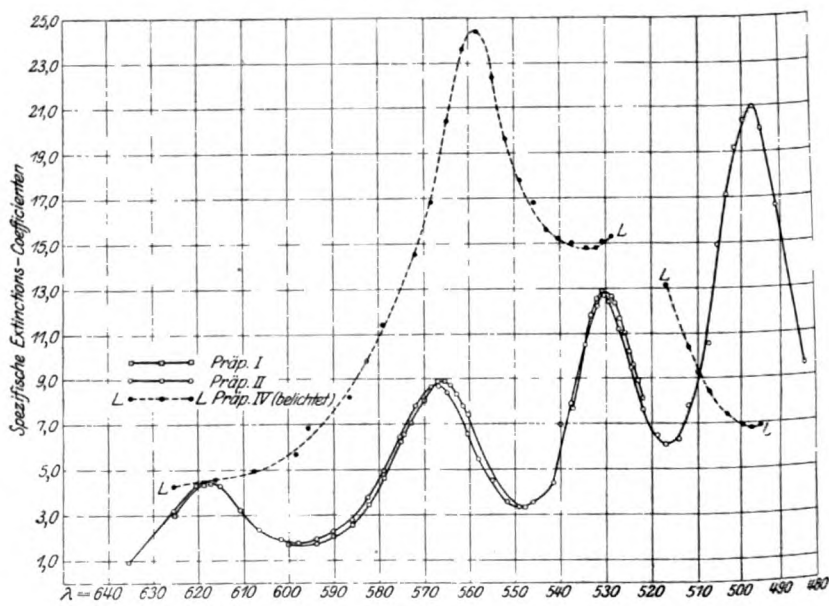


Abb. 2. Ammoniakalisch alkoholische Lösung.

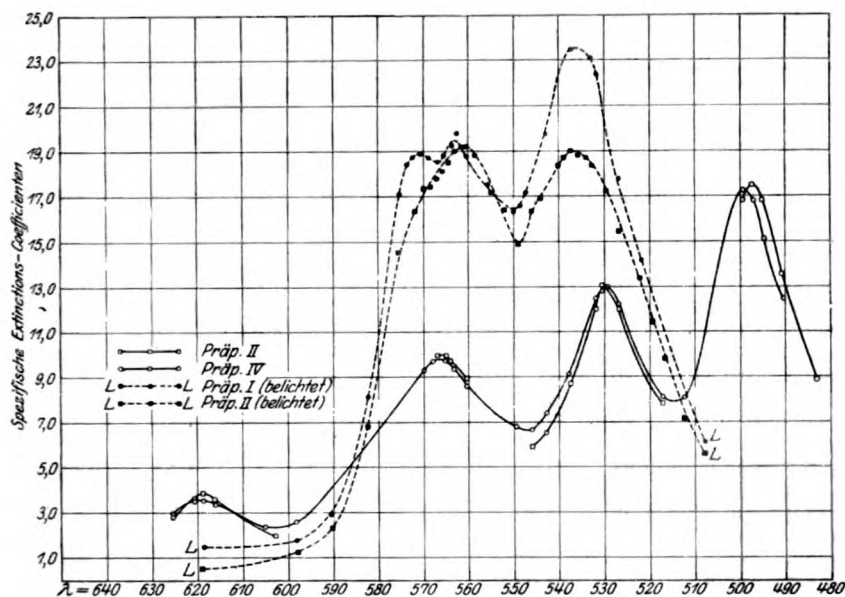


Abb. 3. Essigsäure alkoholische Lösung.

So wurden die den vier Absorptionsstreifen entsprechenden Maxima an folgenden Stellen gefunden (die nachfolgend angeführten Wellenlängen entsprechen jeweils der Mitte des betreffenden Spektralausschnittes):

		1. Streifen $\mu\mu$	2. Streifen $\mu\mu$	3. Streifen $\mu\mu$	4. Streifen $\mu\mu$
In der neutralen Lösung ¹⁾	Präparat I	619,7—618,7	568,5—567,8	530,6	497,3
	„ II	618,7	568,5	530,6	497,6
	„ III	620,7	568,5	530,6	497,6
In der ammoniakal. Lösung	„ I	n. u. ²⁾	565,7	531,1	n. u. ²⁾
	„ II	618,7	565,0	530,6	497,2
In der essig-sauren Lösung	„ I	618,7	n. u. ²⁾	530,6	497,2
	„ IV	618,7	565,0	529,6	499,3

Im Durchschnitt aller Präparate werden also gefunden die Stellen:

In der neutralen Lösung . . .	619,5	568,4	530,6	497,5
In der ammoniakalischen Lösung	618,7	565,3	530,8	497,2
In der essigsäuren Lösung . . .	618,7	565,0	530,1	497,2

¹⁾ Präparat IV konnte hier nicht berücksichtigt werden, da in seiner Lösung bloß je eine Ablesung ausgeführt wurde, und zwar an den vier Stellen, wo sich die Maxima der übrigen Präparate befunden haben.

²⁾ Nicht untersucht.

Spezifische Extinktionskoeffizienten alkoholisch

Spektral- ausschnitt $\mu\mu$	Unbelichtet							
	neutral				ammoniakalisch		essigsaar	
	Präparat I	Präparat II	Präparat III	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat II	Präparat IV
653,9—638,3	0,401	—	—	—	—	—	—	—
642,6—628,1	1,00	1,28	1,05	—	—	0,866	—	—
632,5—618,5	3,10	3,73	3,55	—	3,03	3,17	2,84	2,97
627,6—613,7	4,04	4,53	4,17	4,25	—	4,32	3,49	3,51
626,6—612,8	4,10	—	—	—	—	—	—	—
625,7—611,9	4,10	4,57	4,07	—	4,52	4,57	3,75	3,52
624,7—611,0	3,89	—	—	—	—	4,46	—	—
623,7—610,1	—	4,31	3,72	—	—	—	—	—
622,7—609,2	3,61	—	—	—	—	4,32	3,36	3,41
617,9—604,8	—	—	—	—	—	3,18	—	—
613,2—600,7	1,96	2,45	1,87	—	—	2,30	—	—
611,4—598,9	—	—	—	—	—	—	—	2,27
609,6—597,2	—	—	—	—	—	—	—	—
608,7—596,8	—	2,09	1,77	—	—	1,94	—	—
607,8—595,6	1,73	—	—	—	—	—	—	—
606,0—593,9	1,74	—	—	—	1,90	—	—	—
604,4—592,4	1,82	2,17	1,66	—	—	1,73	2,02	2,48
602,7—590,9	1,84	—	—	—	—	—	—	—
601,9—590,1	—	—	—	—	—	—	—	—
601,1—589,4	1,91	—	—	—	—	—	—	—
600,2—588,7	—	—	—	—	1,79	1,92	—	—
599,3—587,9	—	—	—	—	—	—	—	—
598,5—586,9	—	—	—	—	—	—	—	—
597,6—586,1	—	—	—	—	—	—	—	—
596,7—585,4	—	—	—	—	—	—	—	—
595,9—584,6	2,24	2,69	2,25	—	2,08	2,27	—	—
595,1—583,8	—	—	—	—	—	—	—	—
594,3—583,1	—	—	—	—	—	—	—	—
592,8—581,6	—	—	—	—	—	—	—	—
592,0—580,8	—	—	—	—	2,59	2,74	—	—
589,8—578,8	—	—	—	—	—	—	—	—
588,3—577,5	3,74	4,43	4,08	—	3,45	3,78	—	—
586,5—576,0	—	—	—	—	—	—	—	—
584,2—573,9	—	—	—	—	4,58	4,92	—	—
580,4—570,4	6,51	7,32	6,88	—	6,34	6,45	—	—
579,8—569,7	—	—	—	—	6,50	—	—	—
578,5—567,9	—	—	—	—	7,12	—	—	—
577,1—566,9	—	8,49	8,00	—	—	7,80	—	—
575,6—565,6	—	—	—	—	8,15	—	—	—
574,9—564,9	7,89	—	—	—	—	—	—	9,22
574,2—564,2	7,96	—	—	—	—	—	—	—
573,6—563,4	8,01	8,98	8,38	8,04	8,67	8,62	—	—
572,8—562,8	8,00	—	—	—	—	—	—	—
572,2—562,1	7,82	—	—	—	8,83	8,75	9,88	9,74
571,4—561,4	7,71	—	—	—	—	—	—	—
570,7—560,7	7,50	—	—	—	8,90	—	—	—
570,0—559,9	7,24	8,30	7,68	—	—	8,43	9,84	9,75

5.

Hämatoporphyrinlösungen bei verschiedener Reaktion.

Unbelichtet						Belichtet				
salzsauer						neutral	ammo- niakal.	essigsauer	mittelst. salzsauer	
stark sauer	mittelstark sauer			stark sauer		Präparat IV	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat IV
at	Präparat II	Präparat I	Präparat II	Präparat I	Präparat II					
16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	0,679	—	—	—	1,47	4,18	—	—	—
	—	—	—	—	—	1,56	4,20	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	1,36	0,538	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	—	—	—	—	—	1,61	—	—	—	—
4	2,70	2,39	2,40	2,52	2,61	—	4,45	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	4,99	5,74	5,73	6,20	6,16	—	5,30	1,72	1,13	5,52
5	—	6,71	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	6,80	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	7,20	—	—	—	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	7,42	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	7,49	—	7,55	—	—	—	—	—	—
	—	7,53	—	7,46	—	—	—	—	—	—
10	6,09	7,40	7,33	—	7,41	—	6,78	2,90	2,29	6,88
	—	7,51	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	7,18	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	6,89	—	—	—	—	—	—	—	—
	6,04	—	7,14	—	6,93	—	8,20	—	—	7,42
10	6,09	6,73	6,70	—	6,76	—	—	—	—	—
36	6,16	6,62	6,65	6,61	6,71	—	9,82	8,07	6,77	6,52
	6,32	6,78	6,75	6,70	6,89	14,2	—	—	—	—
	6,87	—	7,04	—	7,25	16,1	11,3	—	—	7,00
38	8,06	7,79	7,21	—	8,05	—	13,0	17,0	14,5	7,90
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	14,9	—	18,4	—	—
	9,28	—	8,70	—	8,86	—	14,5	18,8	16,3	9,30
	—	—	—	—	—	—	—	18,9	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	17,3	—
1,1	11,2	9,48	9,55	—	9,50	12,2	16,9	18,8	17,4	10,8
	—	—	—	—	—	—	—	18,5	17,8	—
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	18,8	18,1	—
	12,8	—	10,9	—	10,8	9,98	20,4	—	—	—

Spektral- ausschnitt uu	Unbelichtet							
	neutral				ammoniakalisch		essigsauer	
	Präparat I	Präparat II	Präparat III	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat II	Präparat IV
569,3—559,4	6,91	—	—	—	8,70	—	—	—
567,9—558,2	—	—	—	—	8,32	—	—	—
566,6—557,0	5,68	—	—	—	7,79	—	—	—
565,6—556,1	—	6,52	5,79	5,50	7,39	6,56	8,93	8,61
563,3—553,9	—	—	—	—	—	5,42	—	—
562,3—553,3	—	—	—	—	—	—	—	—
560,9—552,1	—	—	—	—	—	—	—	—
559,6—550,9	3,43	4,49	3,77	—	—	4,48	—	—
558,4—549,7	—	—	—	—	—	—	—	—
557,2—548,4	—	—	—	—	—	—	—	—
556,6—547,8	—	4,06	3,42	—	—	3,52	—	—
555,9—547,1	—	—	—	—	—	—	—	—
554,7—545,9	3,06	—	—	—	—	—	—	—
554,1—545,4	—	—	—	—	—	—	—	—
553,5—544,8	2,84	4,09	3,30	—	—	3,28	—	6,78
552,3—543,6	3,17	—	—	—	3,30	—	—	—
551,7—543,0	—	—	—	—	—	—	—	—
550,5—541,6	—	4,49	3,78	—	—	3,53	—	6,84
547,3—539,0	3,90	5,37	4,85	—	—	4,23	6,44	7,34
545,6—537,5	—	—	—	—	—	—	—	—
544,4—536,3	—	—	—	—	—	6,98	—	—
543,2—535,1	—	—	—	—	—	—	—	—
541,4—533,6	—	8,53	7,81	8,27	7,79	7,84	8,70	9,16
541,3—533,6	7,27	—	—	—	—	—	—	—
539,7—532,1	—	—	—	—	—	—	—	—
538,6—531,0	—	—	—	—	—	10,5	—	—
538,0—530,5	—	—	—	—	—	—	—	—
537,1—529,5	8,26	—	—	—	11,9	—	—	—
536,5—528,9	—	—	—	—	—	—	—	—
535,9—528,4	12,3	12,0	11,81	—	12,4	12,2	12,0	12,5
535,3—527,9	12,3	—	—	—	—	—	—	—
534,7—527,4	12,8	—	—	—	12,8	—	—	—
534,1—526,9	13,1	12,5	11,9	12,7	—	12,8	13,0	12,4
533,8—526,3	13,0	—	—	—	12,7	—	—	—
533,3—525,8	13,0	—	—	—	—	12,5	12,8	13,0
532,8—525,3	12,5	12,2	11,6	—	12,7	—	—	—
532,2—524,9	12,3	—	—	—	—	—	—	—
531,7—524,3	—	—	—	—	12,3	—	—	—
530,7—523,3	11,5	10,0	10,5	—	11,7	11,2	12,1	12,4
529,7—522,3	—	—	—	—	11,0	—	—	—
528,6—521,0	—	—	—	—	10,2	—	—	—
528,1—520,6	9,64	—	—	—	—	9,45	—	—
527,6—520,1	—	—	—	—	9,55	—	—	—
526,5—519,1	—	—	—	—	8,88	—	—	—
525,5—518,1	7,72	7,15	7,43	—	8,08	7,72	—	—
523,0—515,8	—	—	—	—	—	6,49	—	—
521,4—514,5	6,51	5,95	6,14	—	—	—	—	—
520,3—513,6	6,15	—	—	—	—	6,06	7,79	8,4
519,3—512,7	6,16	—	—	—	—	—	—	—

(Fortsetzung.)

[illegible]

Spektral- ausschnitt $\mu\mu$	Unbelichtet							
	neutral				ammoniakalisch		essigsauer	
	Präparat I	Präparat II	Präparat III	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat II	Präparat IV
517,8—511,4	—	—	—	—	—	6,35	—	—
517,4—510,9	—	—	—	—	6,45	—	—	—
515,6—508,9	7,45	6,48	7,81	—	—	7,91	—	8,06
511,1—504,6	11,9	8,86	12,1	—	—	10,5	—	—
506,4—500,4	17,1	12,5	17,2	—	—	17,1	—	—
502,3—496,2	20,9	15,1	20,8	—	—	20,5	16,8	17,2
501,6—495,4	20,9	15,4	20,9	—	—	—	—	—
500,6—494,6	21,2	15,7	—	—	21,4	—	—	—
500,2—494,2	21,2	—	21,1	21,29	—	21,0	17,5	16,9
499,8—493,8	21,0	—	—	—	—	—	—	—
498,9—493,0	21,0	—	—	—	—	—	—	—
498,1—492,3	21,1	—	—	—	—	20,0	16,8	15,2
496,0—490,2	—	14,8	18,7	—	—	—	—	—
494,0—488,3	18,0	—	—	—	17,1	16,6	13,5	12,5
492,0—486,5	—	12,4	14,9	—	—	—	—	—
490,1—484,6	14,0	—	—	—	—	—	—	—
488,1—482,9	—	9,77	11,5	—	—	—	—	—
486,2—481,1	10,0	—	—	—	—	9,47	8,82	—
482,8—477,5	7,93	—	—	—	—	—	—	—

Es läßt sich also wohl sagen, daß sich die ammoniakalischen und essigsauren Lösungen bezüglich der Stellen der Absorptionsmaxima identisch verhalten und ihnen gegenüber in Normallösung die Absorption am ersten Streifen um ein Geringes, am zweiten Streifen um etwa $3\mu\mu$ verschoben ist.

Vergleicht man die Intensität der Lichtabsorption der dreierlei Lösungen an den Stellen der vier Maxima, so ergibt sich folgendes. Die spezifischen Extinktionskoeffizienten betragen:

		Am I. Max.	Am II. Max.	Am III. Max.	Am IV. Max.
In der neutralen Lösung	Präparat I	4,09	8,01	13,1	21,2
	" III	4,17	8,38	11,9	21,1
In der ammoniakal. Lösung	" I	n. u. ¹⁾	8,90	12,8	n. u. ¹⁾
	" II	4,57	8,75	12,8	21,0
In der essigsauren Lösung	" II	3,75	9,88	13,0	17,5
	" IV	3,52	9,75	13,0	17,2

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß die Lichtabsorption a) in der neutralen und ammoniakalischen Lösung am IV. Maximum vollkommen gleich, am III. Maximum wahrscheinlich ebenfalls gleich,

¹⁾ Nicht untersucht.

(Fortsetzung.)

Unbelichtet						Belichtet				
salzsauer						neutral	ammo- niakal.	essigsauer		mittelst. salzsauer
schwach sauer		mittelstark sauer		stark sauer		Präparat IV	Präparat IV	Präparat I	Präparat II	Präparat IV
Präparat I	Präparat II	Präparat I	Präparat II	Präparat I	Präparat II					
—	5,82	—	—	—	3,85	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	5,03	—	3,72	—	3,61	—	10,4	—	7,14	4,50
4,95	4,52	2,77	3,32	3,21	3,34	—	8,40	5,96	5,63	3,88
—	3,94	—	2,88	—	—	—	7,40	—	—	3,32
3,81	3,33	2,54	2,33	—	2,32	5,69	6,92	—	—	2,72
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	5,73	6,82	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	5,75	6,90	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1,95	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

hingegen am I. Streifen wahrscheinlich, am II. sicherlich in der ammoniakalischen Lösung stärker ist;

b) in der essigsauen Lösung ist die Lichtabsorption am III. Streifen so groß, wie in den anderen Lösungen, am II. Streifen größer, am I. und IV. Streifen weit geringer.

B. Hämatoporphyrin in neutraler (rein alkoholischer), in ammoniakalischer und essigsaurer Lösung; belichtet. Wie unter A. ausgeführt, zeigen Präparat I und III in neutraler alkoholischer Lösung eine hinreichende, stellenweise vorzügliche Übereinstimmung, während, wie aus Abb. 1 ersichtlich, Präparat II am vierten nach Violett hin gelegenen Maximum sich abweichend verhält, indem die Absorption hier eine weit geringere ist, als an den beiden anderen Präparaten. Für diese Erscheinung glaubte ich folgende Erklärung annehmen zu dürfen, die, wie gleich gezeigt werden soll, sich als wichtig erwiesen hat. An Präparat I hat es 3 Tage mit 5 Beobachtungsperioden von je 2 bis 3 Stunden gedauert, bis die Ablesungen längs des ganzen Spektrums ausgeführt waren; dabei wurde, da auch die Schichtdicke der Lösung jedesmal geändert werden mußte, die in der Beobachtungsröhre befindliche Lösung stets erneuert, und war eine und dieselbe Lösung nie längere Zeit hindurch dem intensiven Licht der Metallfadenglühlampe ausgesetzt. An Präparat II mußte, da zufällig die richtige Konzentration

	am 2. Streifen	am 3. Streifen
in der neutralen Lösung des Präp. IV	um etwa 7 $\mu\mu$ rotwärts	um etwa 10 $\mu\mu$ rotwärts
in der ammoniakal. Lösung d. Präp. IV	um etwa 7 $\mu\mu$ violettwärts	?
in der essigsäuren Lösung des Präp. I	verdoppelt	um etwa 7 $\mu\mu$ rotwärts
in der essigsäuren Lösung des Präp. II	um etwa 7 $\mu\mu$ violettwärts	um etwa 7 $\mu\mu$ rotwärts

verschoben.

In der ammoniakalischen Lösung des Präparats IV weisen die Ablesungen leider gerade im Bereiche des dritten Maximums eine Lücke auf, so daß die Zunahme der Lichtabsorption in diesem Gebiete aus Abb. 2 zwar klar hervorgeht, jedoch nicht angegeben werden kann, ob und wie weit dieses Maximum infolge der Belichtung verschoben wurde. Die Verdoppelung des zweiten Streifens in der essigsäuren Lösung des Präparats I war auch spektroskopisch deutlich wahrnehmbar; merkwürdigerweise war jedoch von einer Verdoppelung an der essigsäuren Lösung des Präparats II weder spektroskopisch, noch spektrophotometrisch irgend etwas wahrzunehmen.

Ein definitives Urteil über die Folgen einer Belichtung von Hämatoporphyrinlösungen läßt sich meines Erachtens auf Grund obiger Versuche nicht schöpfen; hierzu hätte es einer weit größeren Zahl dieser überaus mühseligen Ablesungsreihen bedurft. Denn es ist ja durchaus möglich, daß bezüglich jeder einzelnen Lösungsart (neutral, ammoniakalisch, essigsauer) eine geeignete Belichtungsdauer gefunden werden kann (länger oder kürzer als die oben angewendete), die dann an allen Lösungen zu einer identischen Veränderung der Lichtabsorption und einer identischen Verschiebung der Maxima führt.

C. Hämatoporphyrin in salzsaurer alkoholischer Lösung; unbelichtet. Die rein alkoholischen Lösungen der oben besprochenen Präparate I und II habe ich mit verschiedenen Mengen konzentrierter Salzsäure verdünnt, und zwar:

mit	3 Tropfen	der konzentrierten Säure	zu	50 ccm	der Lösung,
„	3 ccm	„	„	50	„ „ „
„	10 „	„	„	50	„ „ „

wodurch die von mir in der Generaltabelle und in den Kurven als „schwach“, „mittelstark“ und „stark sauer“ bezeichneten Lösungen entstanden waren. Ihre spektrophotometrische Prüfung ergab (Abb. 4) zwei charakteristische Streifen, deren Lage in allen Lösungen nahezu dieselbe war.

			1. Streifen	2. Streifen
			$\mu\mu$	$\mu\mu$
Schwach sauer . . .	Präparat I		590,3	552,8
	" II		590,3	552,8
Mittelstark sauer . .	" I		591,1	551,6
	" II		590,3	551,6—550,4
Stark sauer	" I		591,8	551,6—550,4
	" II		590,3	551,6
Im Mittel aller Versuche:			590,7	551,8

Die Lage der Maxima ist also in allen Lösungen eine recht gleichmäßige; nicht so die Stärke der Lichtabsorption an diesen Maxima. Es gab unter den oben angeführten Lösungen, deren Kurven auf kürzere oder längere Strecken dermaßen identisch verlaufen, daß es technisch unmöglich war, sie in der Abb. 4 unterzubringen; andererseits zeigen

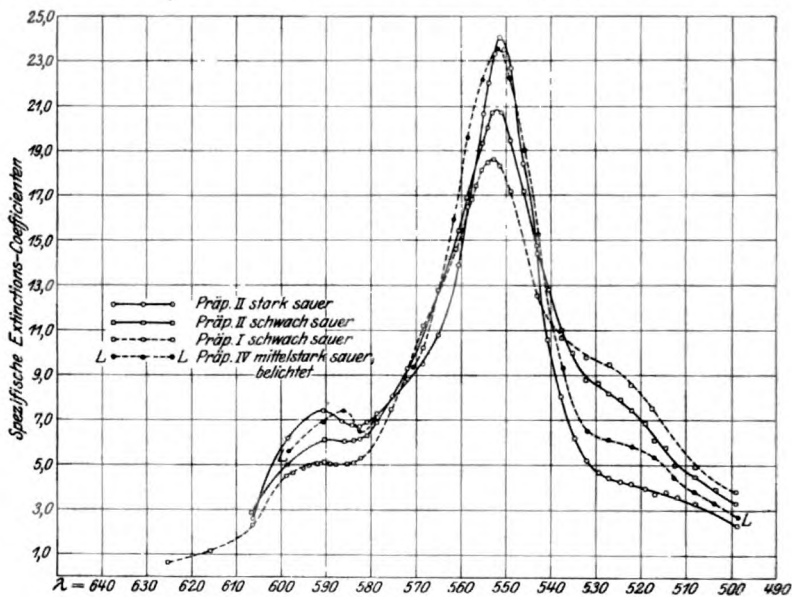


Abb. 4. Salzsäure alkoholische Lösung.

die Kurven, die in Abb. 4 abgebildet sind, stellenweise recht erhebliche Unterschiede, die keinesfalls Ablesungs- oder anderen Versuchsfehlern zugeschrieben werden können. Man muß also annehmen, daß unter Einwirkung der Säure irgendwelche fortschreitenden Veränderungen im Farbstoffmolekül, vielleicht intramolekulare Umlagerungen, vor sich gehen, die naturgemäß nicht in allen Lösungen mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen. Eine Abhängigkeit dieser Umsetzungen von der Säurekonzentration war jedoch nicht zu erkennen.

D. Belichtete salzsaure alkoholische Lösungen. Diese Versuche wurden in derselben Weise, wie die unter B besprochenen ausgeführt, doch zeigte es sich, daß, wie aus Abb. 4 hervorgeht, die Kurve der belichteten Lösung sich von der der unbelichteten nicht mehr unterscheidet, als diese selbst voneinander. *In salzsauren Lösungen kommt es also unter Lichteinwirkung nicht zu den Veränderungen, die in neutralen, ammoniakalischen und essigsauren Lösungen in so ausgesprochener Weise stattfinden.*

$$E. \text{ Der Quotient } \frac{E \ 565,6 - 556,1}{E \ 541,4 - 533,7}$$

Hüfner hatte an einer Reihe von Hämoglobingasverbindungen den Quotienten der Extinktionskoeffizienten an zwei bestimmten Stellen des Spektrums berechnet und auf diese Weise Werte erhalten, die für je einen des rein dargestellten Farbstoffs charakteristisch sind.

Ich habe annähernd genau an denselben Stellen 565,6 bis 556,1 und 541,4 bis 533,7 μ die Quotienten an den von mir oben besprochenen Lösungen des Hämatoporphyrins berechnet und folgende Werte erhalten:

	Präparat I	Präparat II	Präparat III	Präparat IV
Neutrale Lösung	—	1,31	1,35	—
Ammoniakalische Lösung	1,05	1,20	—	—
Essigsaure Lösung (unbelichtet)	—	—	—	1,06
Schwach salzsaure Lösung	—	0,714	—	—
Mittelschwach salzsaure Lösung	—	0,636	—	—
Stark salzsaure Lösung	0,607	0,578	—	—

Nach den vorläufigen Bestimmungen von Bürker¹⁾, die annähernd an derselben Spektralstellen ausgeführt wurden, hatte der genannte Quotient die Werte:

$$\begin{array}{lcl} \text{in der alkoholischen Lösung} & 1,11 \\ \text{„ „ sauren „} & 0,76 \end{array}$$

¹⁾ K. Bürker, Tigerstedts Handb. d. physiol. Meth. 2 (1), 200.

Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatoporphyrins. II.

Von

Paul Hári.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 3. November 1922.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Vor etwa Jahresfrist ging mir von Herrn Primarius Universitätsdozenten *O. Hasenfeld* in Budapest — dem an dieser Stelle bester Dank abgestattet sei — ein als hämatoporphyrinhaltig bezeichneter Harn eines Patienten zu, von dem, da er sehr bald verstarb, nicht ermittelt werden konnte, ob er an einer sogenannten kongenitalen Porphyrinurie gelitten hatte, oder aber einer Intoxikation (Sulfonal, Trional usw.) erlegen war. Da die Frage der vielleicht verschiedenen im Harn vorkommenden hämatoporphyrinartigen Körper trotz neuerer eingehender Arbeiten noch immer nicht geklärt ist, führte ich an dem aus dem Harn isolierten Farbstoff spektrophotometrische Bestimmungen längs einer möglichst großen Strecke des sichtbaren Teiles des Spektrums aus. Anderen Methoden gegenüber hat diese den Vorteil, daß mit ihrer Hilfe die Stellen der maximalen Absorption wahrscheinlich mit derselben Genauigkeit bestimmt werden können, dabei jedoch die Lichtabsorption überall, an den Stellen der Maxima sowohl wie auch an den dazwischen gelegenen Strecken, zahlenmäßig, und zwar von jedem subjektiven Momente frei, bewertet werden kann.

Die Untersuchungen wurden mittels eines nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *Königschen* Spektrophotometers (große Beleuchtungsvorrichtung) ausgeführt, über dessen Justierung und Kalibrierung ich an einer anderen Stelle¹⁾ berichtet hatte. Von der üblichen Reduktion der aus den Ablesungen berechneten Extinktionskoeffizienten auf die einheitliche Farbstoffkonzentration von 0,1 %, also von der Berechnung der sogenannten spezifischen Extinktionskoeffizienten mußte ich Abstand nehmen, da die Konzentration der Lösungen weder durch vorangehendes Abwägen des Farbstoffs, noch aber durch Eindampfen der Lösungen und Trockensubstanzbestimmung mit einiger

¹⁾ *Paul Hári*, diese Zeitschr. 95, 266, 1919.

Aussicht auf Genauigkeit durchgeführt werden konnte. Um aber trotzdem die in verschiedenen Serien erhaltenen Werte vergleichen zu können, wurden die am roten Ende des Spektrums erhaltenen Werte einander ungefähr gleichgesetzt und alle übrigen Werte im selben Verhältnisse umgerechnet. Diese umgerechneten Werte sind insgesamt in einer Generaltabelle am Schlusse dieser Arbeit mitgeteilt, außerdem wurden sie als Ordinaten in ein Koordinatensystem eingetragen, das die Wellenlängen auf der Abszisse enthält. Die Schnittpunkte wurden zu Kurven vereinigt, die im Texte untergebracht sind.

A. Alkoholisch-ammoniakalische Lösung.

Der Harn wurde nach der *Salkowskischen* Vorschrift¹⁾ mit einer Mischung, bestehend aus gleichen Volumina gesättigter Barytlauge und einer 10 proz. Lösung von Bariumchlorid gefällt, der Niederschlag

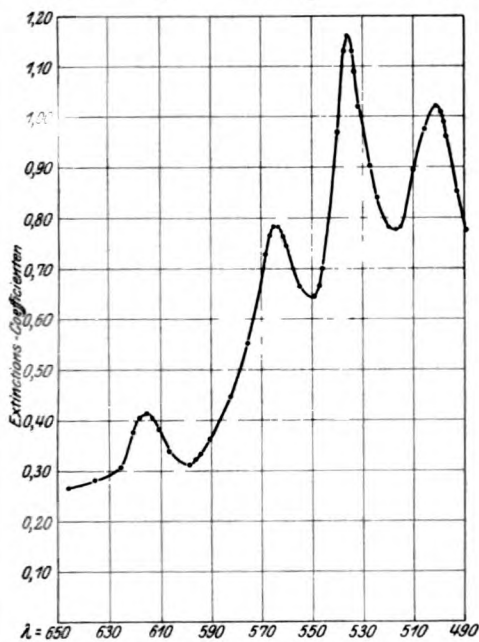


Abb. 1.

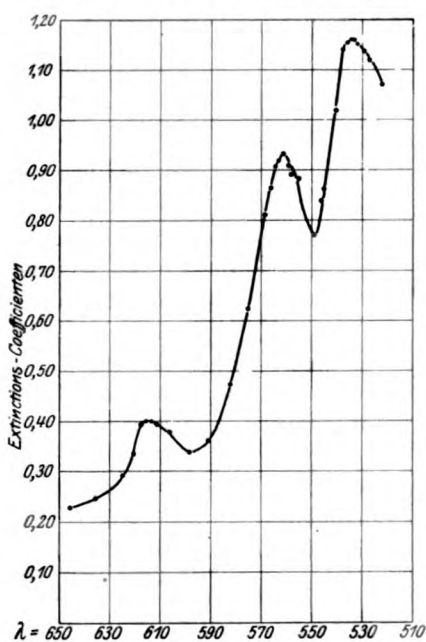


Abb. 2.

zweimal mit Wasser, einmal mit Alkohol gewaschen, mit Salzsäure und Alkohol verrieben, das Filtrat mit Ammoniak übersättigt, wobei ein rotbrauner Niederschlag entstand. Das schwach rot gefärbte Filtrat wurde spektrophotometrisch untersucht.

¹⁾ E. Salkowski, H. 15, 294, 1891.

Wie aus Abb. 1 und 2 ersichtlich, waren im Spektrum von Präparat I vier Absorptionsmaxima sichtbar, wie dies dem allbekannten alkalischen Hämatoporphyrinspektrum entspricht; in der Kurve von Präparat III sind bloß drei Maxima abgebildet, jedoch nur aus dem Grunde, weil hier die Untersuchung aus äußeren Ursachen nicht über die Stelle 520 $\mu\mu$ fortgesetzt werden konnte. Die Maxima befanden sich, wie aus nachstehender Zusammenstellung ersichtlich, annähernd genau an den von früheren Autoren bezeichneten Stellen. Insbesondere fällt die stellenweise vorzügliche Übereinstimmung zwischen *Lewin*, *Miethe* und *Stengers* und meinen Befunden auf. Die Maxima finden sich bei den verschiedenen Autoren an folgenden Spektralstellen:

<i>Lewin, Miethe und Stenger</i> ¹⁾	<i>Schumm</i> ²⁾	<i>Goto</i>	<i>Hári</i>	
			Präparat I <i>uu</i>	Präparat III <i>uu</i>
$\mu\mu$	$\mu\mu$	$\mu\mu$		
614	618,5 bzw. 619,5	619	616	616
563	566,5 " 567	565	565	562
535	542 " 540	531	536	535
501	507 " 504,5	497	501	?

Vergleicht man die Kurven in Abb. 1 und 2 mit den von *Kiko Goto*³⁾ mitgeteilten, so ist eine weitgehende Analogie im Verhalten der Lichtabsorption längs des untersuchten Spektrums nicht zu verkennen, obwohl an *Gotos* frisch untersuchten (unbelichteten) Lösungen die Lichtabsorption am vierten Streifen erheblich *stärker* ist als am dritten Streifen, in der von mir untersuchten Lösung *geringer*. Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich diesen Unterschied der Einwirkung des Lichtes zuschreibe, der die Lösung während der spektrophotometrischen Prüfung ausgesetzt war. Denn aus *Gotos* 1 Jahr später ausgeführten Versuchen ging es hervor, daß die Lichtabsorption einer ammoniakalischen (sowie auch einer neutralen und essigsauren) Hämatoporphyrinlösung im Bereiche des ersten und vierten Streifens unter Lichteinwirkung allmählich abnimmt, ja gänzlich verschwinden kann; eine Erscheinung, die mir zur Zeit, als ich diese Untersuchungen ausführte, noch nicht bekannt war.

B. Alkoholisch-ammoniakalische Lösung nach der Übersäuerung mit Salzsäure.

Da die ammoniakalischen Lösungen des isolierten Farbstoffs die Maxima annähernd genau an den Stellen aufwiesen, die an der ammo-

¹⁾ *L. Lewin, A. Miethe und E. Stenger, Arch. f. d. ges. Physiol.* 118, 80, 1907.

²⁾ *O. Schumm, H.* 90, 1, 1914.

³⁾ *Kiko Goto, diese Zeitschr.* 135, 329, 1923.

niakalischen Lösung reinsten Hämatoporphyrins beschrieben werden, andererseits auch keine Lichtabsorptionsmaxima aufweisen, die auf einen fremden Farbstoff hinwiesen, war zu erwarten gewesen, daß die ammoniakalische Lösung mit Salzsäure übersäuert und spektrophotometrisch geprüft, sich wieder so verhalten wird wie die salzsaure Lösung

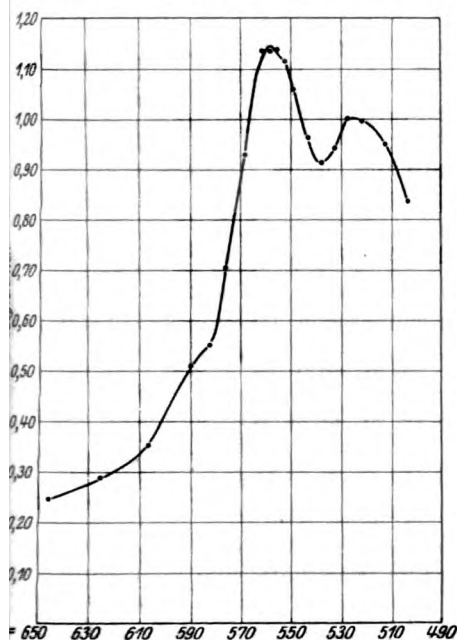


Abb. 3.

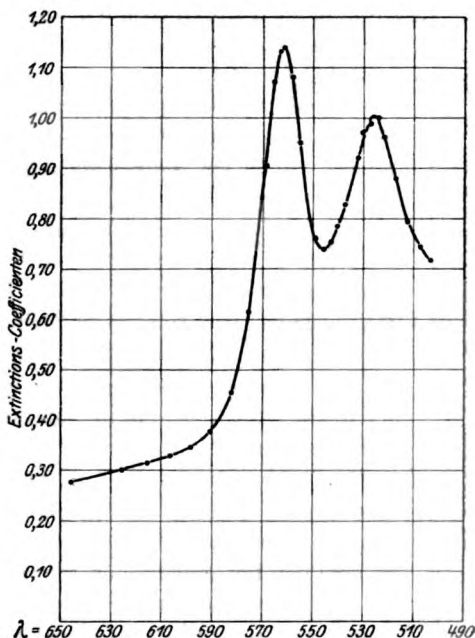


Abb. 4.

des reinen Hämatoporphyrins. Zu meiner Überraschung war dies jedoch durchaus nicht der Fall und weisen die in Abb. 3 und 4 abgebildeten Kurven die Maxima an Stellen auf, die von den Angaben früherer Autoren wesentlich verschieden sind, wie dies aus nachfolgender Zusammenstellung hervorgeht:

Lewin, Miethe und Stenger ¹⁾	Schumm ²⁾	Goto ³⁾	Häri	
			Präparat I	Präparat II
μμ	μμ	μμ	μμ	μμ
593	595	591	—	—
571	574	—	—	—
550	552	552	559	559
540	—	—	—	—
—	—	—	528	524
520	—	—	—	—
510	—	—	—	—

¹⁾ l. c. — ²⁾ l. c. — ³⁾ l. c.

a) Dem von den Autoren beschriebenen ersten, rotwärts gelegenen Maximum entsprechend fand sich bloß an Präparat I ein kleiner Buckel der Kurve bei etwa 595 $\mu\mu$; an Präparat III war auch hiervon nichts zu sehen; b) der von den Autoren um 572 $\mu\mu$ herum beschriebene Streifen war überhaupt nicht vorhanden; c) der um 551 $\mu\mu$ gelegene Streifen der Autoren ist um etwa 8 $\mu\mu$ rotwärts, nach 559 $\mu\mu$ verschoben; d) *ein starkes Maximum fand sich an Präparat I bei 528 $\mu\mu$, an Präparat III bei 524 $\mu\mu$, also an einer Stelle, wo die überwiegende Mehrzahl der Autoren bisher kein Absorptionsmaximum gefunden hatte.* [Nur von Ellinger und Riesser¹⁾ ist in einem Falle von Trionalvergiftung unter anderen auch ein sehr schwacher Streifen bei 527 $\mu\mu$ beschrieben.]

C. Alkohollisch-salzsäure Lösung des durch Ammoniak erzeugten Niederschlags.

Es ergab sich nun die weitere Frage, ob vielleicht nur die in Ammoniak lösliche Fraktion des Farbstoffs die oben beschriebene Lichtabsorption bei 528 bzw. 524 $\mu\mu$ aufweist, während der durch Ammoniak gefällte Anteil in salzsaurer Lösung sich so verhält, wie das Hämatoporphyrin der Autoren, das in Salzsäure gelöst, an dieser Stelle kein Absorptionsmaximum hat?

Um dies zu entscheiden, habe ich den Niederschlag, der in der salzsauren Lösung der ursprünglichen Barytfällung durch Zugabe von Ammoniak entstanden war, wieder in salzsaurem Alkohol gelöst und der spektrophotometrischen Untersuchung zugeführt; und zwar wurde von Präparat I sowohl eine schwach saure, wie auch eine stark saure Lösung angefertigt. Die Lichtabsorption dieser Lösungen ist durch die Kurven in Abb. 5 und 6 wiedergegeben. Als wichtigstes Ergebnis dieser Untersuchungen soll gleich hervorgehoben werden, daß das von mir oben neu beschriebene starke Absorptionsmaximum in beiden Lösungen des Präparats I vorhanden war, und zwar bei 527 $\mu\mu$. (An einer ebenso behandelten Lösung von Präparat III, dessen Kurve ich nicht abgebildet habe, war dieses Maximum aus dem Grunde nicht nachweisbar, weil die Ablesungen an dieser Lösung aus äußeren Ursachen violettwärts bloß bis gegen 542 $\mu\mu$ fortgesetzt werden konnten.)

Es bestand jedoch auch bezüglich der übrigen Maxima eine Übereinstimmung zwischen diesen und den sub B. beschriebenen Lösungen; indem weiter rotwärts ein starkes Maximum bei etwa 562 $\mu\mu$ vorhanden war, noch weiter rotwärts ein relatives Maximum in Form eines Buckels der Kurve bei etwa 595 $\mu\mu$. (Allerdings war der Verlauf der Lichtabsorption in den beiden aus Präparat I hergestellten Lösungen insofern ungleicher, als, wie aus Abb. 5 und 6 zu ersehen, in der

¹⁾ Ellinger, Alexander und Otto Riesser, H. 98, 1, 1916.

schwächer sauren Lösung das violettwärts gelegene, in der stärker sauren Lösung das rotwärts gelegene Maximum das stärkere war.)

Es hat sich also ergeben, daß die beiden Fraktionen des aus dem Harn isolierten Farbstoffs, nämlich der sub B. besprochene im Ammoniak gelöst verbliebene und dann angesäuerte Anteil, und der sub C. besprochene durch Ammoniak gefällte und dann wieder in Salzsäure gelöste Anteil sich, spektrophotometrisch geprüft, nahezu identisch verhalten, insbesondere aber, daß *beide Fraktionen den bisher nicht beschriebenen Streifen bei etwa 527 $\mu\mu$ aufweisen.*

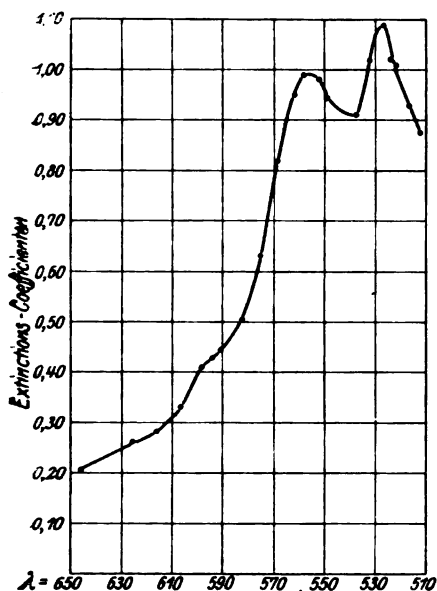


Abb. 5.

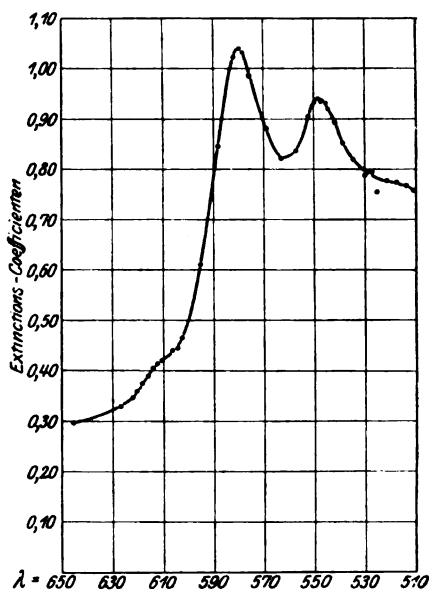


Abb. 6.

Fragt man nun danach, ob es auf Grund des von mir bei etwa 527 $\mu\mu$ aufgefundenen Maximums richtig ist, anzunehmen, daß der aus dem Harn isolierte Farbstoff von Hämatoporphyrin verschieden ist, so müssen folgende Möglichkeiten erwogen werden:

a) Es kann sich um Hämatoporphyrin handeln, das mittels des Barytverfahrens aus dem Harn isoliert, also nicht in chemisch reinem Zustande erhalten wurde. Dann müßte aber weiterhin auch angenommen werden, daß die Verunreinigung in ammoniakalischer Lösung beinahe farblos ist, daher die Maxima des reinen Hämatoporphyrins auch in der unreinen Lösung beinahe unverändert bleiben; während dieselbe Verunreinigung in saurer Lösung gefärbt ist, daher einzelne Maxima des reinen Hämatoporphyrins vermißt werden, dafür

ein neues Maximum bei $527\text{ }\mu\mu$ auftritt. Diese Möglichkeit ist, obwohl sie *durchaus unwahrscheinlich* ist, nicht ganz von der Hand zu weisen.

b) Es war denkbar, daß im nativen Harn wirkliches Hämatoporphyrin enthalten war, das jedoch während der Isolierung mittels des Barytverfahrens eine derartige (vielleicht strukturelle) Veränderung erleidet, durch die das Absorptionsmaximum bei $527\text{ }\mu\mu$ hervorgerufen wird. Um in dieser Beziehung Klarheit zu erlangen, hat Herr Goto eines seiner reinen Hämatoporphyrinpräparate, an denen er die in der vorangehenden Arbeit mitgeteilten Versuche ausführte, in Lösung gebracht, mit etwas gelöstem Phosphat versetzt und nun den Farbstoff regelrecht nach dem Barytverfahren wieder isoliert und die salzsaure Lösung des Farbstoffs vor und nach der Ammoniakbehandlung untersucht: *von einem Maximum bei $527\text{ }\mu\mu$ herum war auch unter diesen Umständen nichts zu sehen.*

Nach allem dem kann also mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß der von mir untersuchte Farbstoff im Harne

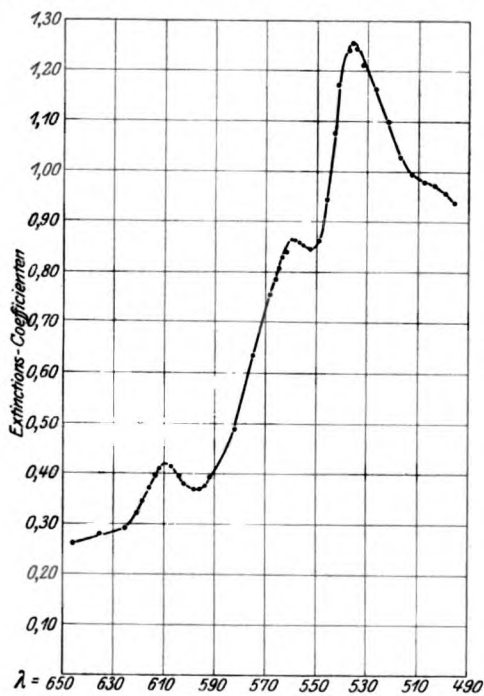


Abb. 7.

des erwähnten Kranken, wenn auch dem Hämatoporphyrin recht nahe stehend, dennoch mit Hämatoporphyrin nicht identisch war; daß es also auch in diesem Falle folgerichtig ist, nicht von einer Hämatoporphyrinurie, sondern bloß, mehr allgemein gehalten, von einer Porphyrinurie zu sprechen.

Anhangsweise soll hier noch über die Ergebnisse derspektrophotometrischen Bestimmungen berichtet werden, die ich an dem mit Ammoniak versetzten Harne selbst ausgeführt habe.

Wie der Kurve in Abb. 7 zu entnehmen ist, waren an dem ammoniakalisch gemachten Harn drei der vier Maxima, die für die ammoniakalische Farbstofflösung charakteristisch sind, sehr deutlich zu sehen.

Vergleicht man die Lage der drei im Harne aufgefundenen Maxima mit der Lage derselben in der ammoniakalischen Farbstofflösung, so ergibt sich, daß die beiden ersten derselben im Harne ziemlich erheblich violettwärts verschoben sind, eine Erscheinung, die, wie aus nachstehender Zusammenstellung ersichtlich, bereits von *Schumm*¹⁾ beschrieben wurde.

Isolierter Farbstoff (<i>Bäri</i>) $\mu\mu$	Ammoniakalischer Harn (<i>Bäri</i>) $\mu\mu$	Harn mit Kalilauge versetzt (<i>Schumm</i>) $\mu\mu$
616 bzw. 616	610	611 bzw. 614 bzw. 612
585 " 562	560	559 bzw. 560
536 " 535	536	538 " 538

Generaltabelle.
Extinktionskoeffizienten.

Spektralausschnitt $\mu\mu$	Isolierter Farbstoff						Harn mit starkem NH ₃ versetzt (Abb. 7)
	Ammoniakalische Lösung		Ammoniakalische Lösung mit HCl übersäuert		Ammoniakalische Fällung von Präp. I gelöst in		
	Präp. I (Abb. 1)	Präp. III (Abb. 2)	Präp. I (Abb. 3)	Präp. III (Abb. 4)	schwacher HCl (Abb. 5)	starker HCl (Abb. 6)	
653,9—638,3	0,266	0,228	—	0,277	0,209	0,247	0,262
642,6—628,1	0,281	0,244	—	—	—	—	0,278
632,5—618,5	0,305	0,291	0,297	0,290	0,260	0,286	0,292
627,6—613,7	0,378	0,359	—	—	—	—	0,323
625,0—611,4	0,405	0,387	—	—	—	—	0,346
622,7—609,2	0,416	0,398	—	0,315	0,283	—	0,372
620,5—606,9	0,405	0,398	—	—	—	—	0,396
617,9—604,8	0,380	0,388	—	—	—	—	0,410
613,2—600,7	0,338	0,355	0,330	0,335	0,334	0,353	0,409
610,7—598,5	—	—	—	—	—	—	0,395
608,7—596,8	—	—	0,347	—	—	—	0,379
606,3—594,3	—	—	0,362	—	—	—	—
604,4—592,4	0,313	0,337	0,375	0,346	0,409	—	0,370
602,1—590,5	0,324	—	0,389	—	—	—	0,373
600,2—588,7	0,333	—	0,406	—	0,427	—	0,377
597,9—586,5	—	—	0,417	—	—	—	0,387
595,9—584,6	0,362	0,361	0,419	0,377	0,445	0,506	0,400
592,0—580,8	—	—	0,442	—	—	—	—
590,0—579,1	—	—	0,445	—	—	—	—
588,3—577,5	0,447	0,472	0,465	0,454	0,505	0,550	0,489
584,2—573,9	—	—	—	—	—	—	—
580,4—570,4	0,599	0,624	0,610	0,615	0,683	0,705	0,637
577,1—566,9	—	—	—	—	—	—	—
573,6—563,4	0,728	0,809	0,846	0,903	—	0,929	0,755
571,7—561,7	0,768	0,862	—	—	—	—	0,706
570,0—559,9	0,785	0,904	—	1,072	—	—	0,809

¹⁾ l. c.

Generaltabelle. (Fortsetzung.)

Spektralausschnitt μμ	Isolierter Farbstoff						Harn mit starkem NH ₃ versetzt (Abb. 7)
	Ammoniakalische Lösung		Ammoniakalische Lösung mit HCl übersäuert		Ammoniakalische Fällung von Präp. I gelöst in		
	Präp. I (Abb. 1)	Präp. III (Abb. 2)	Präp. I (Abb. 3)	Präp. III (Abb. 4)	schwacher HCl (Abb. 5)	starker HCl (Abb. 6)	
568,3—558,4	0,781	0,915	—	1,128	—	—	0,830
566,6—557,0	0,768	0,933	1,021	1,142	—	1,138	0,839
564,7—555,3	0,746	0,908	1,042	—	—	—	0,866
563,3—553,9	—	0,890	1,084	1,084	—	1,140	0,863
561,2—552,3	—	—	—	—	—	—	0,861
559,6—550,9	0,666	0,886	0,985	0,955	0,820	1,132	0,854
556,6—547,8	—	—	—	—	—	1,115	0,844
553,5—544,8	0,645	0,770	0,884	0,759	0,950	1,062	0,863
552,0—543,2	0,666	0,840	—	—	—	—	—
550,5—541,6	0,699	0,859	—	0,758	0,990	—	0,944
549,0—540,3	—	—	—	—	—	—	—
547,3—539,0	—	—	0,822	0,752	—	0,962	1,077
545,8—537,5	—	—	—	—	—	—	1,172
544,4—536,3	0,971	1,042	—	0,784	0,983	—	—
541,3—533,6	1,130	1,136	0,839	0,827	0,946	0,913	1,240
540,0—532,3	1,164	1,152	—	—	—	—	1,254
538,6—531,0	1,131	1,167	—	—	—	—	1,244
537,3—529,7	1,089	1,166	—	—	—	—	—
535,9—528,4	1,019	1,150	0,908	0,920	1,022	0,942	1,210
533,3—525,8	—	1,136	0,934	0,969	—	—	—
532,0—524,5	—	—	0,942	—	—	—	—
530,7—523,3	0,905	1,122	0,936	0,987	1,092	0,999	1,167
529,4—521,9	0,842	—	0,932	—	—	—	—
528,1—520,6	—	—	0,919	1,000	1,021	—	—
525,5—518,1	—	1,073	0,893	0,963	1,010	0,994	1,100
523,0—515,8	0,782	—	0,850	—	—	—	—
520,3—513,6	0,789	—	—	0,880	0,937	—	1,030
517,8—511,4	0,783	—	0,804	—	—	—	—
515,6—508,9	—	—	—	0,796	0,871	0,900	0,994
513,4—506,7	0,898	—	0,789	—	—	—	—
511,1—504,6	—	—	0,796	0,744	—	—	0,981
508,6—502,5	0,974	—	0,756	—	—	—	0,964
506,5—500,4	—	—	—	0,720	—	0,836	0,975
504,4—498,3	1,025	—	0,777	—	—	—	0,952
502,3—496,2	1,012	—	—	—	—	—	0,957
501,2—495,2	0,990	—	—	—	—	—	—
500,2—494,2	0,939	—	0,775	—	—	—	—
498,1—492,3	—	—	—	—	—	—	0,938
496,0—490,2	0,854	—	0,766	—	—	—	—
494,0—488,3	—	—	0,758	—	—	—	—
492,0—486,5	0,775	—	—	—	—	—	—

Zur Kenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen.

III. Mitteilung¹⁾.

Wirkung von Oxydationsmitteln auf die Empfindlichkeit.

Von

Eugen Petry.

(Aus dem Zentralröntgeninstitut des Landeskrankenhauses Graz.)

(Eingegangen am 6. November 1922.)

In den vorhergehenden Mitteilungen wurde ausgeführt, daß die Ermittlung der Bedingungen der Röntgenreaktion durch geeignete Variation der Versuchsanordnung ein Mittel darstellt, um über diese, einer Erforschung auf anderem Wege derzeit noch ganz unzugängliche Reaktion einige Aufschlüsse zu gewinnen, und es konnte dies an zwei Beispielen — dem Einfluß der Stoffwechselgröße und jenem des Hydratationsgrades auf die Empfindlichkeit — gezeigt werden.

Zu den allerwesentlichsten Bedingungen von chemischen Reaktionen, deren Kenntnis die wertvollsten Schlüsse auf deren Wesen gestattet, gehört *das Milieu*, in welchem die Reaktionen ablaufen. Stellt doch das Studium des Einflusses von verschiedenartigen Zusätzen bei Reaktionen, die ihrem grobchemischen Verlauf nach bekannt sind, ein souveränes Mittel zur Aufdeckung des feineren Mechanismus dar; um so eher läßt sich erwarten, daß mit Hilfe derartiger Untersuchungen auch bei dieser noch gänzlich unbekannten Reaktion gewisse Aufschlüsse zu gewinnen sein werden. Es schien mir daher lohnend, in systematischer Weise die Beeinflußbarkeit der Röntgenschädigung durch Milieuänderungen zu prüfen.

Eine solche Fragestellung gewann durch die Ergebnisse meiner bisherigen Untersuchungen an Berechtigung: denn diese hatten gezeigt, daß das ausschlaggebende Moment für die Empfindlichkeit pflanzlicher Objekte deren *chemische Zusammensetzung* darstellt. Besonders wichtig erscheint dabei, daß auch jene starken Sensibilitätsunterschiede, wie

¹⁾ Siehe diese Zeitschr. 119, 23; 128, 326.

sie sich während des Keimungsvorgangs in den Zellen eines und desselben Objekts im Laufe von Stunden ausbilden, als durch die chemische Zusammensetzung begründet befunden wurden, da damit gezeigt war, daß eine kurzdauernde und gewiß nicht allzu tief gehende Änderung der chemischen Zusammensetzung¹⁾ einer Zelle mit wesentlichen Sensibilitätsunterschieden einhergehen kann.

Nun sind photochemische Reaktionen, zu denen ja die Röntgenschädigung zufolge ihres niedrigen Temperaturkoeffizienten auch gehört, aber Vorgänge, die nicht freiwillig verlaufen, also nicht ausschließlich durch die chemischen Spannkkräfte des Systems betriebene Vorgänge, sondern sie werden durch äußere Energiezufuhr (Lichtstrom) veranlaßt und auf Grund dessen hat man in ihnen vielfach (besonders auch in der radiologischen Literatur) Vorgänge *vorwiegend physikalischer Natur* erblickt, für deren Ablauf ausschließlich die Größe der vom System aufgenommenen Lichtenergie in Betracht komme. Würde dies den Tatsachen entsprechen, so wären diese Reaktionen nur durch solche Zusätze zu beeinflussen, welche die Lichtabsorption erhöhen. Damit steht jedoch die praktische Erfahrung der aktinischen Photochemie in Widerspruch, die eine Fülle von Einzelfällen ergeben hat, wo optisch unwirksame Zusätze von ausschließlich chemischer Wirksamkeit sich als bestimmend für den Ablauf mancher Reaktionen erwiesen haben, und die nähere Erkenntnis des Mechanismus der Lichtvorgänge hat gezeigt, daß bei diesen die chemischen Spannkkräfte des Systems in hervorragendem und oft ausschlaggebendem Maße mitbeteiligt sind — was sich für viele Lichtreaktionen schon dadurch erweisen läßt, daß sie bei höheren Temperaturen auch ohne Lichteinwirkung freiwillig verlaufen können; und der Ausbau der modernen theoretischen Photochemie lieferte denn auch reichliche Erklärungsmöglichkeiten für die Beeinflussbarkeit photochemischer Vorgänge durch chemisch wirkende Zusätze:

Schon die Abhängigkeit der Reaktionsfähigkeit von der *Form*, in welcher eine Substanz in Lösung vorliegt (z. B. ausschließliche Empfindlichkeit des ionisierten oder des in Komplexform vorliegenden Anteils), unterstellt die Lichtreaktionen von Haus aus dem Massenwirkungsgesetz und bringt mannigfache Möglichkeiten mit sich, durch Verschiebung des Ionengleichgewichts mit Hilfe von Zusätzen die Menge des an der Reaktion teilhabenden Anteils der Substanz, und damit auch den chemischen Effekt der Lichteinwirkung experimentell zu variieren [s. h. *Roloff* (3)]. Bedeutungsvoller ist noch der Umstand, daß die eigentliche Wirkung der strahlenden Energie zumeist in der Herstellung eines gleichgewichtartigen

¹⁾ Über die nachweisbaren Unterschiede in der Zusammensetzung mitotischer und ruhender Kerne, welche möglicherweise der Sensibilitätsdifferenz zugrunde liegen, s. *Unna* und *Golodetz* (1), l. c., S. 330, und *Tischler* (2), l. c., S. 44.

stationären Zustandes besteht, der, ebenso wie rein chemische Gleichgewichte, durch Zusätze von chemischer Wirksamkeit beeinflusst werden kann und daher die Möglichkeit gewährt, durch Entfernung eines der Reaktionsprodukte des Lichtvorgangs (mit Hilfe von rein chemischen Mitteln) das Gleichgewicht fortwährend zu verschieben und so die sonst stationär bleibende Lichtreaktion zu Ende laufen zu lassen. („Chemische Sensibilisierung“ der photographischen Platte durch halogenabsorbierende Stoffe, ferner vielfache gegenseitige Beeinflussungen der Lichtempfindlichkeit von Oxydations- und Reduktionsmittel durch gleichzeitige Anwesenheit des anderen Partners: z. B. Oxalsäure einerseits — molekulares Chlor oder Brom bzw. Mercurichlorid andererseits.)

Im Gegensatz zu all diesen Fällen, bei denen die Zusätze nur im stöchiometrischen Verhältnisse wirksam sind und selbst durch die Reaktion verbraucht werden, gibt es noch reichlichere Fälle, bei denen bereits Spuren des Zusatzes nach Art katalytischer Substanzen die Empfindlichkeit des Systems zu beeinflussen vermögen. Für manche Fälle konnte die Ursache davon darin gefunden werden, daß die Lichtreaktion selbst eine katalytische ist, d. h. auf dem Wege über einen im Lichte entstehenden chemisch wirksamen Katalysator verläuft, der dann eben wie alle Katalysatoren durch Zusätze fördernder oder hemmender Art sehr beeinflusbar ist [Weigert (4)].

Vielfach stellt aber der katalytisch wirkende Zusatz *selbst* den Katalysator der Lichtreaktion dar; zumeist handelt es sich um induzierte Reaktionen mit Übertragung des atmosphärischen (ohne den Zusatz minder wirksamen) Sauerstoffs (also um die Beeinflussung der Oxydationsgeschwindigkeit eines Körpers durch die gleichzeitige Anwesenheit eines leichter oxydablen, der dann den Schrittmacher der ganzen Reaktion abgibt), Vorgänge, deren genauer Mechanismus oft unerforscht oder strittig ist, die aber in ihrem grobchemischen Verlaufe den „gekoppelten Reaktionen mit Übergang in Katalyse“ der Dunkelchemie ähneln. Bei dieser letzteren Gruppe (Metallkatalysatoren, Farbstoffe) ist zwar der Zusatz häufig selbst lichtempfindlich. Das Wesen seiner Wirkung ist aber von seiner *chemischen* Beschaffenheit nicht zu trennen und es ist gewiß bezeichnend für die Auffassung der hier dargelegten Zusammenhänge, daß nunmehr auch die Urtypen „optischer“ Sensibilisierungen ihrem Wesen nach als durch die besonderen *chemischen* Eigenschaften des Sensibilisators veranlaßt erkannt werden konnten: so konnte die „photodynamische“ Wirkung der Fluoresceinderivate auf Fermente und Lebewesen durch *Neuberg* und *Galamboš* (5) auf *chemische* Eigentümlichkeiten dieser Farbstoffe zurückgeführt werden, und auch die *Vogelsche* Farbensensibilisierung der photographischen Platte erscheint heute nicht mehr als ein rein physikalischer Vorgang, als eine Durchbrechung des Gesetzes von *Grotthus-Draper*, sondern als ein besonderer — durch die gleichzeitig bestehende Lichtempfindlichkeit des Sensibilisators komplizierter — Einzelfall von *chemischer* Sensibilisierung (stärkere Reduktionskraft und dementsprechend stärkeres Chlorbindungsvermögen des belichteten Eosins) (Weigert).

Diese Tatsachen eröffnen Ausblicke nach zweierlei Richtungen: *erstens* erscheint die Möglichkeit gegeben, diese Vorgänge in der lebenden Zelle nachzuahmen und so auch einen im Organismus sich abspielenden lichtbiologischen Vorgang durch chemische Zusätze zu beeinflussen. Dadurch wird der Kreis der Sensibilisierungsmöglichkeiten wesentlich erweitert: bei der bisher zugrunde liegenden Auffassung der Röntgen-

reaktion als eines vornehmlich physikalischen Vorganges etwa nach Art einer Verbrühung kamen natürlich hauptsächlich die physikalische Absorptionsbedingungen beeinflussenden *Sekundärstrahler* als Sensibilisatoren in Betracht. Die eben begründete Auffassung der Lichtreaktionen als *chemische* Vorgänge, auf deren Ablauf die chemischen Spannkkräfte des Substrats und eventueller Zusätze entscheidenden Einfluß nehmen, berechtigt nunmehr, auch in den Kreisen der als chemische Beschleuniger von Lichtreaktionen bekannten Stoffe nach einem Röntgensensibilisator Umschau zu halten, in der Erwartung, daß es vielleicht gelingen könne, einen der eben genannten Vorgänge an dem photochemischen System der lebenden Zelle nachzuahmen¹⁾.

Ein Zufallsbefund, den ich anläßlich der Prüfung des Einflusses der Atmungsgröße auf die Empfindlichkeit erhielt, stellt vielleicht bereits eine Erfüllung dieser Erwartung dar: *ich fand mit Cyanpräparaten vorbehandelte Keimlinge empfindlicher als die Kontrollen*. Um so wichtiger erscheint es, durch systematische Untersuchungen zu prüfen, ob es gelingt, weitere derartige Beeinflussungsmöglichkeiten aufzudecken.

Zweitens eröffnet sich uns aber noch die entferntere Möglichkeit, solche Versuchsanordnungen, ebenso wie es bei den früheren Mitteilungen geschehen konnte, in den Dienst der Fragestellung nach der Art und Wesenheit der Röntgenreaktion selbst zu stellen.

Freilich werden wir dabei besonders mit den bedeutenden Schwierigkeiten biologischer Milieuversuche rechnen müssen: die Grundvoraussetzung für das Gelingen der Versuche ist, daß es möglich ist, die Substanz in der für ihre Wirksamkeit notwendigen Konzentration (die eventuell durch ein Maximum laufen kann!) an Ort und Stelle (also an die Kerne der Meristemzellen) zu bringen. Dabei muß natürlich auf dem Transport jede chemische Veränderung der Substanz, welche ihre Reaktionsfähigkeit stört, ausgeschlossen sein, und die Substanz muß an den lichtempfindlichen Körper herantreten, festgehalten werden und eventuell noch bestimmte, für ihre Wirksamkeit erforderliche eigenen Bedingungen (z. B. der Wasserstoffionenkonzentration usw.) erfüllt vorfinden. Und all das muß sich noch im Rahmen des für das Gedeihen des Objekts Zuträglichen abspielen. Bedenkt man, von welchen unvorhersehbaren, scheinbaren Zufälligkeiten die Verteilung eines Fremdstoffes im Organismus beherrscht wird, so ergibt sich daraus, daß *irgendwelche Schlüsse aus negativen Zusatzbefunden nicht zulässig sein werden*.

Aber auch im Falle eines *positiven Befundes* (einer nachweisbaren Beeinflussung der Reaktion durch einen Zusatz) liegen die Verhältnisse um vieles schwieriger als bei einem in vitro angestellten Versuch, bei dem der

¹⁾ Dabei dürfen aber chemisch wirksame Substanzen, welche zufällig aus schweratomigen Komponenten bestehen, nicht ausgeschlossen werden. Im Gegenteil zeigt ja gerade die aktinische Photochemie, daß die staunenswertesten chemischen Lichtwirkungen durch solche Körper vermittelt werden, denen *außer der chemischen Eignung* auch noch die *Fähigkeit intensiverer Lichtabsorption* zukommt, wie z. B. die fluoreszierenden Farbstoffe! Wir werden daher auch hier ceteris paribus einer Substanz mit höherem Atomgewicht der Komponenten den Vorzug geben.

Zusatz zu einer reinen Lösung des lichtempfindlichen Körpers erfolgt, und wo somit der positive Ausfall des Versuchs nur durch eine unmittelbare (wenn auch eventuell katalytische) Beteiligung des Zusatzes an der Reaktion zustande kommen kann, und daher ohne weiteres Rückschlüsse auf deren Wesen gestattet. Das Plasma stellt hingegen ein aus zahlreichen verschiedenartigsten Stoffen aufgebautes, auch in physikalisch-chemischer Hinsicht äußerst unübersichtliches, durch morphologische Differenzierungen noch besonders kompliziertes System dar, das durch die vielfachen und unklaren Stoff- und Energieumsetzungen des Lebensvorganges belebt ist. *Solange wir aber nicht wissen, ob alle diese im Plasma gegebenen Stoffe, Zustände und Vorgänge nicht vielleicht in irgend einer Beziehung zur Röntgenreaktion stehen, können wir auch nicht Sensibilisierungsbefunde ohne weiteres auf eine direkte und unmittelbare Einwirkung des Zusatzes auf die Reaktion selbst beziehen, da wir nicht ausschließen können, daß die Wirkung eine indirekte, nur auf dem Umwege über einen der anderen Plasmabestandteile zustande kommt.*

Vor welchen Schwierigkeiten wir in einem solchen Falle stehen, wird sich am besten aus einem Versuch, das Zustandekommen der oben erwähnten sensibilisierenden Cyanwirkung aus dem sonstigen chemischen Verhalten der Substanz zu erklären, ergeben.

Zunächst wird man wohl auch hier an eine direkte Beeinflussung der Lichtreaktion selbst denken müssen, ganz besonders mit Rücksicht auf die *bekannten chemischen Eigenschaften der Substanz*, von denen einige dafür in Betracht kommen könnten: so vor allem ihre Additionsfähigkeit, welche die für Lichtvorgänge so wesentliche Komplexbildung ermöglicht, ihre große Reduktionsfähigkeit, ihre in der präparativen Chemie benutzte Fähigkeit, synthetische Vorgänge katalytisch zu beschleunigen, die Tatsache, daß einige Cyanderivate lichtempfindlich sind (Bariumplatincyanoür auch gegenüber Röntgenstrahlen!) und selbst photochemische Zersetzungen anderer Stoffe (H_2O_2 durch K_2FeCy_4) einzuleiten vermögen, sowie schließlich die sensibilisierende Wirkung der Blausäure auf Pflanzen gegenüber aktinischer Lichtwirkung (Czapek).

Gerade von der Blausäure sind uns aber auch mehrere *Wirkungen auf den Organismus und seine Bestandteile* bekannt, von denen es nicht ohne weiteres auszuschließen ist, daß sie das Zustandekommen der von uns beobachteten Sensibilisierung vermitteln:

1. Zunächst die *lähmende Wirkung* auf chemisch wirksame *kolloidale Körper*; durch sie ließe sich die Sensibilisierungswirkung erklären, wenn man annimmt, daß im unbeeinflussten Gewebe ein *kolloidaler Hemmungskörper* für die Lichtreaktion vorhanden ist.

2. *Erhöhung* der Permeabilität und insbesondere des *Quellungszustandes* der Zelle, welch letzterer (s. II. Mitteilung) eine Sensibilisierung bedingen könnte.

3. Die *Wirkung* der Blausäure auf *den Atmungs Vorgang* (Reaktionskoppelung zwischen einem Teilvergange der Atmung und der Reaktion?).

4. Wirkung auf die *Atmungsfermente*: Lähmung der Katalase bei Erhaltenbleiben der Peroxydbildung und der Peroxydase [Wo. Ostwald (7), l. c., S. 412, Anmerkung], welche zu Anhäufung von Peroxyden führen muß (Ostwald). *Diese Möglichkeit gewinnt durch die weiter unten S. 366 bis 372 mitgeteilte sensibilisierende Wirkung von Hydroperoxyd an Wahrscheinlichkeit.* Schließlich kann

5. die *Wirkung länger dauernder Behinderung der Atmung auf die Zusammensetzung des Substrats* an und für sich die Bedingungen der Reaktion irgendwie ändern [Zugrundegehen eines Hemmungskörpers oder Entstehen eines Katalysators durch den geänderten Stoffwechselablauf¹⁾].

Die uns bekannten chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Substanz geben also reichlich Veranlassung, an die Möglichkeit einer mittelbaren Beeinflussung der Reaktion zu denken. Ähnliche Erwägungen, wie wir sie bei dieser in ihrer Wirkung auf das lebende Plasma zufällig gut studierten Substanz anstellen mußten, dürfen wir aber dann auch bei Substanzen, über deren Verhalten zu den Bestandteilen und Funktionen der lebenden Organismen wir zufällig weniger unterrichtet sind, nicht als überflüssig ansehen. Bei manchen Substanzen (z. B. bei den in dieser Mitteilung geprüften Schwermetallsalzen) kämen dann noch „optische“ Sensibilisierungswirkungen rohester Art (Sekundärstrahlenemission von der Nachbarschaft der empfindlichen Zellen aus) in Frage.

Aus derartigen Betrachtungen ergibt sich also, *daß wir auch einen positiven Befund nicht zu unmittelbaren Rückschlüssen auf das Wesen und die Natur der Reaktion verwenden dürfen.*

Diese weitgehende Einschränkung der Beweiskraft aller Versuchsergebnisse, deren wir uns von Anfang an bewußt sein müssen, vermag gleichwohl nicht, die Berechtigung derartiger Versuche in Frage zu stellen. Denn, auch abgesehen vom eminenten Interesse der praktischen Röntgenologie am Sensibilisierungsproblem, *muß uns immerhin jeder positive Befund der Erkenntnis des Wesens der Reaktion näherbringen*, wenn auch nicht unmittelbar, so doch *dadurch, daß er beachtenswerte heuristische Fingerzeige gibt*, in deren Richtung dann Versuchsanordnungen von unmittelbarer Beweiskraft einsetzen können.

Zunächst wird überhaupt erst festgestellt werden müssen, ob die oben ausgesprochenen Erwartungen prinzipiell zutreffen, d. h. ob es gelingt, auf Substanzen zu stoßen, welche in reproduzierbarer Weise die Empfindlichkeit von Keimlingen in positivem oder negativem Sinne beeinflussen, ohne daß das Atomgewicht ihrer Komponenten die Wirkung auf rein physikalischem Wege zu erklären imstande wäre, ob also die

¹⁾ Versuche, diese verschiedenen Möglichkeiten durch Ersatz der betreffenden Wirkung der Cyanpräparate durch entsprechend wirksame andere Substanzen experimentell zu prüfen, verliefen ergebnislos. Es konnte weder durch die Permeabilität beeinflussende Mittel, noch durch den Quellungszustand erhöhende Zusätze (Lithiumchlorid 1⁰/₀₀) noch durch Zusätze, welche erfahrungsgemäß Fermente bzw. kolloidale wirksame Körper ähnlich beeinflussen wie HCN (Natriumsulfid, Natriumsulfit, Nicotin) eine sensibilisierende Wirkung erzielt werden.

Die einzige Analogie zur Cyanwirkung stellen (abgesehen vom später ausführlich beschriebenen H₂O₂) Versuche dar, in denen ich 20 Stunden in sauerstofffreier Atmosphäre gehaltene Weizenkeimlinge nach ihrer Rückkehr in atmosphärische Luft wesentlich empfindlicher fand als die Kontrollen. Vielleicht ein Beweis für die in Punkt 5 angedeutete Erklärungsmöglichkeit der Cyanwirkung?

Empfindlichkeit eines Objekts durch kurzdauernde pharmakologische Beeinflussung von rein chemischer Wirksamkeit veränderbar ist. Im konkreten Falle handelt es sich also vornehmlich darum, ob es gelingt, eine Parallele zu unserem Cyanbefunde aufzufinden, welche beweisen würde, daß es sich bei diesem nicht um einen ganz exzeptionellen Einzelfall handelt.

In der vorliegenden Untersuchung habe ich zunächst die *Beeinflußbarkeit der Empfindlichkeit von Keimlingen durch Oxydationsmittel* geprüft. Da die Mehrzahl der aktinischen Lichtkatalysatoren diesen Körperklassen angehört, war dies wohl die nächstliegende Frage, um so mehr, als ja gerade die photochemischen Zersetzungen von Körperbestandteilen auf Ladungsänderungen beruhende Reaktionen darstellen (Metallkatalysen von *Neuberg* (8), „photodynamische“ Wirkungen der fluoreszierenden Farbstoffe, katalytische Wirkung von HgCl_2 auf organische Säuren usw.) und da vor allem auch die Lichtschädigungen belebter biologischer Objekte (*Downes* und *Blunt* (9) unter Sauerstoffbeteiligung verlaufen. Ja, auch in der spärlichen röntgenphotochemischen Literatur gibt es einen Befund, der für das Bestehen von Beziehungen der Röntgenreaktion zu den genannten photochemischen Oxydationsreaktionen sprechen könnte, nämlich die von *G. Schwarz* (10) entdeckte Kompressionsdesensibilisierung der Haut. Wenn nun beim Zustandekommen dieser Erscheinung eine Beteiligung von Differenzen im Austausch gelöster fester Stoffe auch nicht auszuschließen ist, so kommt dafür der Gaswechsel schon wegen seines Umfangs und wegen der Geschwindigkeit des Austauschs und Verbrauchs weit eher in Betracht. Da der *Schwarzsche* Befund wohl¹⁾ nicht anders gedeutet werden kann, als daß bei kurzdauernder Unterbrechung der Blutzufuhr die Milieubedingungen der Reaktion eine die Empfindlichkeit herabsetzende Änderung erfahren, so besteht die Möglichkeit, daß die an die verschiedenen Phasen des Gaswechsels (Sauerstoffaufnahme, Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureabgabe) gebundenen Milieuänderungen des Zellsubstrats entscheidenden Einfluß auf die Empfindlichkeit der Gewebe besitzen, sei es daß im erstickten Gewebe ein Hemmungskörper angereichert ist, oder daß bei der Erstickung gewisse durch den Sauerstoffzutritt gegebene, die Lichtreaktion fördernde Momente in Wegfall kommen, welche entweder in einer Koppelung der Lichtreaktion an irgend einen Teilvorgang des Verbrennungsprozesses der lebenden Substanz bestehen könnten oder in einer fördernden Wirkung molekularen oder im Gewebe aktivierten (peroxydartigen?) Sauerstoffs.

¹⁾ Siehe I. Mitteilung S. 35, und II. Mitteilung S. 342.

Diese Überlegungen ließen die Gruppe der Oxydationsmittel als besonders geeignetes Beispiel erscheinen, um der Frage nach der Beeinflußbarkeit der biologischen Röntgenreaktion durch Milieuänderungen von chemischer Wirksamkeit näher zu treten.

I. Zur Versuchsmethodik.

Der Versuchszweck, Beeinflussungen der Empfindlichkeit bestrahlter Objekte durch vorherige Zusätze nachzuweisen, schien mir, angesichts der Unsicherheit bezüglich der Verteilung der Zusätze in der ganzen Pflanze, zu fordern, sich dadurch optimale Bedingungen zu schaffen, daß die Wirkung der Bestrahlung an dem mit der Lösung in innigste Berührung gelangenden Teile der Pflanze, der Wurzel, verfolgt werde. Es war also Beobachtung der Pflanzen in Wurzelkulturen notwendig und außerdem waren einige die optischen Bedingungen der Strahlenabsorption betreffende Momente¹⁾ bei den Versuchen zu berücksichtigen, die dadurch notwendig wurden (s. weiter unten).

Sonst schloß sich die Versuchsmethodik eng an die in den früheren Mitteilungen (besonders I.) beschriebene an, sowohl was die S. 28 bis 29 beschriebene allgemeine Technik anlangt, als ganz besonders bezüglich der technischen Durchführung des Vergleichs der Röntgeneinwirkung auf vergiftete und unvorbehandelte Pflanzen, S. 35.

Wie dort, wurden dazu zwei verschiedene Versuchsanordnungen verwendet: eine, entsprechend den Versuchen 8, 24, 12, 68, 151, 55, 82, 86 und 76 der ersten Mitteilung, bei welcher zwei vollkommene Serien von bestrahlten und unbestrahlten Objekten verglichen wurden, welche sich (*ceteris paribus*) nur dadurch unterschieden, daß die Hauptserie während der Bestrahlung (seit etwa 1 Stunde) unter Giftwirkung stand, während die Kontrollserie ohne pharmakologische Beeinflussung blieb (Bestrahlung gleichzeitig im zweiten Hauptschnitt einer Röhre). Diese Versuchsanordnung soll hier der Kürze halber als erste Versuchsanordnung bezeichnet werden.

Bei der „zweiten Versuchsanordnung“ wurden in Analogie zu Versuch 67 der ersten Mitteilung zwei Proben miteinander verglichen, welche ebenfalls nebeneinander im zweiten Hauptschnitt einer Röhre bestrahlt wurden, wobei die Hauptprobe mit der Giftlösung vorbehandelt war (also bei der Bestrahlung unter Giftwirkung stand), während die Kontrolle erst unmittelbar nach der Bestrahlung der gleichen Gifteinwirkung (hinsichtlich Zusammensetzung, Konzentration und Dauer) ausgesetzt wurde. Unbestrahlte vergiftete Kontrollen wurden bei dieser nur zu orientierenden Zwecken ausgeführten Methode nicht immer mit gezüchtet. Es konnte darauf um so eher verzichtet werden, als die Sicherheit, eine geeignete Strahlendosis appliziert zu haben, durch vielfache vorher und zwischendurch am gleichen Material ausgeführte andersartige Bestrahlungsversuche gewährleistet war.

Die Wurzelbestrahlungen erforderten²⁾ zunächst *Erzielung gerade abgehender Wurzeln*; bei Weizen empfiehlt sich hierzu Verwendung schmaler Sorten, bei Linsen Vorquellung und vertikale Einbettung der Scheiben

¹⁾ In den Wurzeln.

²⁾ Mit Rücksicht auf die gleichmäßige Strahlenabsorption.

in Sägespäne mit der (durch das Vorquellen sichtbar gemachten) Wurzelanlage nach unten (Keimung der Linsen auf Filtrierpapier ergibt ausnahmslos schiefstehende Wurzeln, die mit Rücksicht auf die Absorptionsverhältnisse nicht brauchbar sind).

Die *Bestrahlung* fand bei einigen Versuchen (mit H_2O_2) im Schälchen statt, wie bei den HCN-Versuchen der ersten Mitteilung, sonst ausnahmslos auf 7×5 cm großen Glasplatten, an deren einem Rande ein etwa 2 cm breiter Filtrierpapierstreifen lag, auf welchen die Keimlinge kurz vor der Bestrahlung aus der Giftlösung übertragen wurden und auf dem sie so ausgerichtet wurden, daß sie mit der Mikropyle nach oben, Seite an Seite lagen, die Wurzeln gegen den freien Rand der Platte zu gerichtet, vom Rande des Filterstreifens jedoch noch 0,5 cm entfernt waren. Die derart nebeneinander liegenden Wurzeln wurden mit einem 1,5 cm breiten Filtrierpapierstreifen bedeckt, der sie gegen den freien Rand der Glasplatte überlagte und dort direkt den als Unterlage dienenden Filterpapierstreifen berührte, so daß die Wurzeln also in einem aus beiden Filterstreifen gebildeten Falz steckten, welcher mittels einer Pipette mit der Giftlösung aufgefüllt wurde.

Eine gleiche Glasplatte wurde in genau der gleichen Weise mit der Kontrollprobe beschickt, wobei der Filterfalz, in dem die Wurzeln steckten, jedoch mit Wasser gefüllt wurde. Beide Platten wurden auf gleich hohe Porzellanschälchen gebracht, welche im zweiten Hauptschnitt ausgerichtet unter der Röhre standen, und sie lagen dort so, daß die beiden mit den Keimlingen bedeckten Filtrierpapierstreifen einander zugewendet waren, ohne sich direkt zu berühren.

Das verwendete Dosimeter lag auf einer dritten gleich hohen Porzellanschale vor den Glasplatten. Bei sämtlichen hier mitgeteilten Versuchen (mit Ausnahme der auf Tabelle II mitgeteilten Versuchsreihe) wurde die Kontrolle der verabfolgten Dosis durch *direkte* Dosimetrie (*Holzkecht-Sabouraud*) geübt.

Die Bestrahlungsproben waren stets von der Röhre (die zumeist in einer Distanz von 16 cm sich befand) durch das in der zweiten Mitteilung beschriebene Kienrußfilterkästchen getrennt.

Besonderes Gewicht wurde auf rasche Übertragung der Keimlinge auf die Platte gelegt.

Selbstverständlich mußte jede verwendete Substanz erst in Vorversuchen geprüft werden, wobei zunächst die Konzentration ermittelt wurde, welche die Wurzeln bei einstündiger Einwirkung (bei H_2O_2 bei $\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung) *eben noch* merklich schädigt (Eintrocknung). Es fand dann eine dieser nahe gelegene nächste Verdünnung (1:5 bis 10) zum Versuch Verwendung.

Die Wurzelkulturen fanden teils auf Filtrierpapier in Glasschalen, teils in Tonkrügen, die mit angefeuchteten Buchenholzsägespänen gefüllt waren, statt (spezielle Technik nach *Grafe* in Biochemische Arbeitsmethoden), teils in Wasserkulturen, wobei die Samen auf paraffinetränktem und mit einem Locheisen perforierten Filtrierpapierblättern ruhten, durch deren Löcher die Wurzeln gesteckt waren und welche auf dem in glasierten Tonkrügen befindlichen Wasser schwammen.

Berücksichtigung fand zumeist nur die erste mediane vortretende Wurzel, welche auch bereits mit der Giftlösung in Berührung gestanden hatte, obwohl die beiden längsten Seitenwurzeln ebenfalls stets gemessen wurden.

Selbstverständlich wurde stets auf unbedingte Einhaltung aller auf Vergleichbarkeit der Proben abzielenden Maßregeln geachtet: Verwendung von Keimlingen gleicher Provenienz, Korngröße Entwicklungszeit und -größe, gleiche optische Bedingungen der Strahlenabsorption (s. oben). Und trotzdem läßt sich bei Bestrahlungsversuchen keine unbedingte Gleichmäßigkeit der Ergebnisse erzielen, da sich (s. I. Mitteilung, S. 29) die *individuellen Differenzen* bei bestrahlten Exemplaren um so viel stärker geltend machen als bei unbestrahlten, daß man gezwungen wird, eine *Verschiedenheit der Empfindlichkeit der einzelnen Individuen* anzunehmen.

Diese Erscheinung steht nicht ohne Analogien auf anderen Gebieten der pflanzenphysiologischen Erfahrung. So äußert sich *Grafe* in seinem Ernährungsphysiologischem Praktikum, S. 299: „Ein fernerer Fehler besteht darin, daß man die individuellen Verschiedenheiten zu wenig berücksichtigt, d. h., daß man gewöhnlich viel zu wenig Individuen für eine Serie von Vergleichsversuchen wählt. Nur durch sehr zahlreiche Pflanzen kann man die Fehler einengen, welche durch individuelle Schwankungen selbst dann eintreten, wenn man für Auswahl von Samen der gleichen Ernte, für Auswahl gleich großer und gleich gesunder Samen gesorgt hat. ... Bei der Wiedergabe der Versuchsergebnisse sollten die Zahlen immer solche Mittelwerte aus einer Reihe von Parallelversuchen darstellen, und man sollte ein Ergebnis nicht für ein solches halten, wenn es nicht mit mindestens 500 bis 600 untereinander vergleichbaren Pflanzen gewonnen ist.“

Diese individuellen Röntgenempfindlichkeitsdifferenzen dokumentierten sich wohl stets nur als eine Abweichung *einzelner Exemplare* von der sonst eingehaltenen Länge, als ein „aus der Reihe fallen“, nicht aber als völlige Regellosigkeit. Zumeist lagen Abweichungen nach der Seite *geringerer* Empfindlichkeit vor.

Bei weiterer Verfolgung erwies sich die *Häufigkeit der Erscheinung als nicht konstant*, sondern von speziellen Momenten abhängig, deren Erkennung Mittel darbot, das störende Phänomen experimentell möglichst beherrschen zu lernen:

1. Sie zeigte sich in ausgesprochenem Maße als verkehrt proportional der Höhe der verabfolgten Dosis. Von einer gewissen Höhe an, kommen solche Unregelmäßigkeiten fast gar nicht mehr zur Beobachtung. Für 7 bis 8 W beträgt diese Höhe: für Pferdebohnen 5 H, für Linsen 8 H, Weizen 10 H. Die daraus sich ableitende *Regel, stets die höchste mit dem jeweiligen Versuchszweck vereinbare Dosis anzuwenden, erlaubt also, die störende Erscheinung zu beseitigen*, sie kommt jedoch nur Desensibilisierungsversuchen zugute (s. die ausgiebige Verwendung in der II. Mitteilung).

2. Untersucht man von einer Spezies mehrere Samenproben verschiedener Provenienz, so zeigen sich auch hier auffallende und mit einer gewissen Regelmäßigkeit wiederkehrende Unterschiede, und es

gelingt leicht, durch Durchmusterung größerer Reihen in den Besitz von möglichst gleichmäßig arbeitendem Versuchsmaterial zu gelangen. Dabei erwies es sich als besonders vorteilhaft von vornherein von reinrassigerem Material auszugehn¹⁾.

Von dem hier genannten Mittel zur Vermeidung dieser individuellen Unterschiede konnte ich auch bei der vorliegenden Untersuchung Gebrauch machen.

II. Ergebnisse.

Als indifferentestes Oxydationsmittel wurde zunächst *molekularer Sauerstoff* versucht: es wurde geprüft, ob Erhöhung seines Partialdrucks in der die Keimlinge umgebenden Atmosphäre einen Einfluß auf die Empfindlichkeit hat.

Daß Anwesenheit molekularen Sauerstoffs für Keimlinge kein unbedingtes Erfordernis für den Ablauf der Röntgenschädigung darstellt, habe ich in der ersten Mitteilung gezeigt. Für Wurmeier war dies bereits von *Perthes* (13) nachgewiesen worden. Dies stellt einen gewissen Gegensatz zum bezüglichen Verhalten anderer lichtbiologischer Vorgänge her: die Eosinlichtwirkung sowie die aktinische Lichtschädigung der Bakterien bedürfen der Sauerstoffanwesenheit.

Oxydative Reaktionen werden natürlich oft durch Erhöhung des Sauerstoffdrucks gefördert. Für gewisse Lichtreaktionen ist jedoch der gegenteilige Einfluß (Hemmung) charakteristisch, z. B. für die *Edersche Lösung*. Nach *Winther* (15) entspricht dieses Verhalten allen Lichtvorgängen, bei welchen das Oxydationsmittel langsamer oxydiert als der freie Sauerstoff.

Vielleicht könnte die von *Wilcock* (16) und von Fräulein *Zülzer* (17) gefundene größere Empfindlichkeit chlorophyllfreier Organismen (im Vergleich zu den chlorophyllhaltigen) damit zusammenhängen.

Von den zehn ausgeführten Versuchen sollen hier vier Mitteilung finden.

Der Sauerstoff wurde genau nach den Angaben von *Poizat* und *Seyewetz* (18) in einer Gasentwicklungsflasche aus mit Schwefelsäure angesäuerter Kaliumpermanganatlösung und Hydroperoxyd entwickelt, in einer Waschflasche (1proz. Natriumcarbonatlösung) gewaschen und dann über die Keimlinge geleitet, welche sich in einer 23 cm langen Glasröhre von 2 cm Durchmesser befanden, deren Mitte durch einen luftdicht abgeschlossenen und angepaßten 9 cm langen Filmzylinder gleicher Weite ersetzt war; das vor diesem gelegene Glasrohrstück war 5 cm lang, das hintere 9 cm.

¹⁾ Ausgedehnte Versuche an reinrassigen Sorten, für deren Überlassung ich der Landesackerbauschule Grottenhof (besonders Herrn Landesrat Ing. *Wizany*) sowie der Wiener Samenkontrollstation (Herrn Hofrat *Pommer*) Dank schulde, zeigten auch, daß die durchschnittliche Empfindlichkeit verschiedener Sorten einer Spezies zumeist [in Übereinstimmung mit der Angabe *Jünglings* (14)] die gleiche ist, daß es hiervon jedoch auch zweifellos Ausnahmen gibt. Ausführliche Mitteilung folgt.

Beim Übergang des letzteren in den Filmzylinder befanden sich zwei ungefähr 1 cm voneinander entfernt stehende Diaphragmen aus Müllerschem Bleigummischutzstoff, die beide an verschiedenen Stellen (das eine zentral, das andere peripher) perforiert waren. In die beiden vor bzw. hinter diesen Diaphragmen gelegenen Abteilungen der Röhre wurden 1,5 cm breite Glasplatten eingeschoben (zur Aufnahme der auf feuchten Filtrierpapierstreifen ruhenden Keimlinge). Am vorderen und hinteren Ende war die Röhre von je einem durch eine Glasröhre durchsetzten Kork abgeschlossen; durch die erstere trat der Sauerstoff ein, durch die letztere wurde er (um nicht den Sauerstoffgehalt der die Kontrollprobe umgebenden Luft zu erhöhen) mittels eines langen Schlauches zum Fenster hinausgeleitet.

Diese Röhre lag, auf Müllergummistoff aufliegend, auf einem Schemel, zu dessen Seite die Gasentwicklungs- und die Waschflasche standen. Die zu bestrahlende Sauerstoffprobe der Keimlinge befand sich im Filmabschnitt der Röhre¹⁾, die nicht zu bestrahlende Sauerstoffprobe (bei Versuchsanordnung I) im dahinter gelegenen Glasabschnitt der Röhre, welcher gegen die Sekundärstrahlen aus dem Filmabschnitt durch das doppelte Bleigummidiaphragma, gegen die primäre Röntgenstrahlung aber durch Umhüllung und Bedecken mit Bleigummistoff und Bleiplatten (3 mm), die bis zum Diaphragma reichten, geschützt war. Die in atmosphärischer Luft zu bestrahlende Kontrollprobe befand sich neben dem Filmabschnitt der Sauerstoffröhre in genau gleicher Höhe mit der Keimlingsprobe in der Filmröhre (Ausrichten durch Visieren) auf einer mit Filtrierpapier bedeckten Glasplatte. Die Keimlinge waren (um gleiche Absorptionsverhältnisse herzustellen) mit einem Film bedeckt. Das Dosimeter (*Holz-knecht-Sabourand*) lag, gegen Belichtung und Feuchtigkeit geschützt, außen von dieser Keimlingsprobe. Die Röntgenröhre befand sich in etwa 20 cm Entfernung von den Keimlingen, genau über der Mitte zwischen beiden zu bestrahlenden Proben, mit der Achse parallel zur Filmröhre (so daß die beiden zu bestrahlenden Proben im zweiten Hauptschnitt ausgerichtet waren). Bei den nach der zweiten Versuchsanordnung ausgeführten Versuchen wurde die Hauptprobe im Filmabschnitt, die Kontrollprobe gleichzeitig mit dieser, frei neben der Filmröhre liegend, bestrahlt. Die letztere Probe wurde nach der Bestrahlung (gleichlang wie vorher die Hauptprobe) mit Sauerstoff behandelt (in der Sauerstoffröhre).

Vor Beginn jeder Bestrahlung wurde so lange Sauerstoff durch die mit den Keimlingen beschickte Filmröhre geleitet, bis sich das Gas am freien Ende des Ableitungsschlauches (Zündholz) nachweisen ließ und erst nach weiteren 10 Minuten langem Durchleiten die Bestrahlung begonnen, während welcher die Sauerstoffentwicklung fortgesetzt wurde. Nur in Versuch 310 wurde erst nach 70 Minuten wärend der Vorbehandlung mit der Bestrahlung begonnen. Bei jedem dieser Versuche wurde die Dosis mit *Holz-knecht*-Tabletten *direkt* ermittelt. Die Röhren wurden bei diesen und den folgenden Versuchen stets zwischen 6 und 7 Waltergraden betrieben.

Versuch 304. Linsen. Zweiter Quellungstag. Wurzellänge 3 mm. Erste Versuchsanordnung. Beginn der Bestrahlung 20 Minuten nach Beginn des Sauerstoffstroms. Distanz 21 cm. Dosis 9 H.

Länge der oberirdischen Teile nach 18 Tagen:

¹⁾ Welche vor dem Leuchtschirm geprüft worden war.

Hauptprobe: Unbestrahlt (Mittel von 10 Exemplaren): 146 mm. Bestrahlt (Mittel von 12 Exemplaren): 60 mm (41 %).

Kontrollprobe: Unbestrahlt (Mittel von 9 Exemplaren): 140 mm. Bestrahlt (Mittel von 10 Exemplaren): 61 mm (43 %).

Versuch 307. Gerste, 45stündige Quellung. Wurzellänge 2 mm. Zweite Versuchsanordnung. 22 Minuten lange Vorbehandlung mit Sauerstoff. Distanz 20 cm. Dosis 10 H.

Länge der Proben (oberirdische Teile) 17 Tage danach:

Unbestrahlte Probe (Mittel von 9 Exemplaren): 169 mm.

Bestrahlte Hauptprobe (Mittel von 20 Exemplaren): 86 mm.

Bestrahlte Kontrollprobe (Mittel von 21 Exemplaren): 88 mm.

Versuch 309. Gerste, 33stündige Quellung. Wurzellänge 4 mm. Zweite Versuchsanordnung. 18 Minuten dauernde Vorbehandlung mit Sauerstoff. Distanz 19 cm. Dosis 10 H.

Länge der Proben nach 25 Tagen:

Unbestrahlte Probe: 254; 247; 222; 213 (Mittel 234 mm).

Bestrahlte Hauptprobe: 33; 25; 26; 33; 36; 36; 29; 34; 30; 33; 29; 29; 33; 34; 38; 31; 32 (Mittel 31,8 mm).

Bestrahlte Kontrollprobe: 35; 36; 24; 32; 27; 26; 22; 34; 26; 37; 35; 38; 26; 22; 26; 32 (Mittel 29,8 mm).

Versuch 310. Weizen, 36stündige Quellung. Wurzellänge 10 mm. Zweite Versuchsanordnung. 70 Minuten währende Vorbehandlung im Sauerstoffstrom. Distanz 20 cm. Dosis 7 H. Kultur auf Filtrierpapier.

Länge der längsten Wurzel nach 20 Tagen:

Unbestrahlte Probe: 125; 121; 125; 124; 114; 113; 144 (Mittel 123 mm).

Bestrahlte Hauptprobe: 68; 35; 44; 49; 35; 45; 37; 55; 74; 64; 35; 46 (Mittel 48,5 mm).

Bestrahlte Kontrollprobe: 45; 50; 64; 58; 46; 43; 46; 44; 45; 52; 57 (Mittel 50 mm).

Wie man sieht, ist das Ergebnis bei allen vier mitgeteilten Versuchen ein übereinstimmendes: sowohl bei Linsen als bei Weizen und Gerste konnte ein Unterschied in der Empfindlichkeit der im Sauerstoffstrom behandelten Objekte und der Kontrollen nicht nachgewiesen werden, weder bei Versuchsanordnung I noch bei Versuchsanordnung II, auch nicht bei dem unter günstigsten Bedingungen für die Sauerstoffaufnahme durchgeführten Versuch 310. Das gleiche Ergebnis hatten 6 weitere (hier nicht mitgeteilte) Versuche an Linsen und Erbsen).

Es kommt also in diesen Befunden weder eine fördernde noch eine hemmende Wirkung zum Ausdruck.

Nach Pfeffer (19), I, S. 84, dringt Sauerstoff leicht in Pflanzenzellen ein. Allerdings haben wir trotzdem keine absolute Garantie, daß die strahlenempfindlichen Partien unserer Objekte während der Bestrahlung unter Sauerstoffeinwirkung gestanden haben.

Es wurde sodann eine Reihe von *Oxydationsmitteln in gelöster Form* auf ihre Wirksamkeit geprüft, und zwar ebensowohl solche mit hohem Sauerstoffpotential als auch Sauerstoffüberträger. Fast durchweg wurden nur Substanzen verwendet, welchen auch die Fähigkeit zu-

kommt in vitro ablaufende photochemische Reaktionen (des aktinischen Lichts oder auch der Röntgenstrahlen) zu beschleunigen.

Mit Ausnahme einer einzigen Substanz — H_2O_2 — erwiesen sich alle als unwirksam.

Auf eine Wiedergabe der Versuchsberichte glaube ich zugunsten der ungleich wichtigeren, später zu beschreibenden positiven Experimente verzichten zu dürfen.

Es erwiesen sich in Versuchen an Weizen als unwirksam: Verdünnte Salpetersäure; 0,07 % Chlorwasser; Bromwasser (1 : 20,000); Quecksilberchlorid (1 : 100,000); Silbernitrat (1 : 100,000); Bromsilber (gesättigt 1 : 10); Mangansulfat (1 : 10,000); Ferrosulfat und Ferrichlorid (1 : 10 Millionen); Cersulfat (1 : 20,000); Urannitrat (1 : 5000); Kaliumbichromat (1 : 50,000); Kaliumpermanganat (1 : 60,000); Benzochinon (1 : 10,000). In Versuchen an Linsen (Anfärbung der Wurzelspitzen): Methylenblau (1 : 10,000); Methylgrün (1 : 10,000); Alizarinblau S. B. (1 : 10,000).

Bei Durchsicht dieser Aufzählung muß es zunächst erstaunlich erscheinen, daß die Sensibilität pflanzlicher Objekte unter so vielfältigen toxikologischen Eingriffen, welche — auch ganz abgesehen von unserer Fragestellung — voraussichtlich mannigfaltige und tiefgehende Änderungen im Chemismus der Zellen mit sich bringen, sich unbeeinflußt erhalten kann. Und wenn wir auch im Sinne unserer einleitenden Ausführungen unseren Befunden durchaus keine entscheidende, abschließende Bedeutung beimessen können, sondern mit der Möglichkeit rechnen müssen, daß nächste Nachprüfungen der Versuche mit irgendwie (Spezies, Konzentration, Dauer) veränderter Technik die vorliegenden Ergebnisse umstoßen können, so befremdet es doch, Substanzen von so hoher photochemischer Aktivität, wie molekulares Chlor und Uran, insbesondere aber auch *Quecksilberchlorid, Eisenchlorid und Silbersalze* unwirksam befunden zu haben, drei Körper, welche sich in der Röntgenphotochemie der unbelebten Welt bei Strahleneinwirkung unter Abgabe von positiven Ladungen zersetzen und welche daher auch in vitro organische Stoffe (Gelatine, Oxalsäure) röntgenkatalytisch zu zersetzen vermögen.

Ein durchweg anderes Ergebnis lieferten die Versuche mit *Hydroperoxyd*: *es erwiesen sich in nahezu allen Versuchen die vorbehandelten Proben als empfindlicher wie die Kontrollen.*

Schon während der Vergiftungsversuche selbst zeigte sich ein durchgreifender Unterschied gegen die übrigen Oxydationsmittel. 2 bis 3 Minuten nach dem Eintauchen der Keimlinge in die Lösung *begannen sich die Spitzen sämtlicher Wurzeln auf etwa 2 bis 3 mm Ausdehnung intensiv rot zu färben.* Dieser unter lebhafter Blasenbildung auftretende Befund, der gewiß nur ein Gegenstück zu der Beobachtung *Pfeffers*¹⁾ über Verfärbung des Zellsaftes der Wurzeln von *Vicia faba* (und anderer pflanzlicher Objekte) durch H_2O_2 darstellt, ist wohl als ein *unzweifelhafter Beweis für das Ein-*

¹⁾ l. c., I, S. 554.

dringen des Giftes in das Gewebe anzusprechen, wie wir bei den Versuchen mit den anderen Oxydationsmitteln keinen besitzen.

Ich lasse nun zunächst die Beschreibung zweier in der ersten Anordnung durchgeführter Versuche folgen.

Versuch 95. Etwa 36stündig gequellter Weizen. Wurzellänge 5 bis 6 mm. 10 vol.-proz. Verdünnung des offizinellen H_2O_2 -Präparats. Beginn der Bestrahlung nach 7 Minuten dauernder Vergiftung. Gesamtdauer der Vergiftung 9 Minuten. Dosis ungefähr 7 H. (16 cm) Sägespänekultur. Wurzellänge (längste Wurzel) nach 10 Tagen:

Hauptprobe: Unbestrahlt: 82; 103; 95; 97; 104; 107; 99; 97; (Mittel 98 mm).

Bestrahlt: 34; 42; 45; 40; 47; 31; 41; 37 (Mittel 39,6 mm = 40 %).

Kontrollprobe: Unbestrahlt: 107; 135; 93; 114; 120; 95; 125 (Mittel 112 mm).

Bestrahlt: 83; 87; 81; 71; 108; 78; 102; 86; 71 (Mittel 85,2 mm = 76 %).

Bei diesem Versuch ließ auch die Beobachtung der *oberirdischen Teile* eine Beeinflussung der Empfindlichkeit dieser durch die Behandlung mit H_2O_2 erkennen: bei der Hauptprobe betrug deren Länge in der bestrahlten Serie 60 % von der Länge der unbestrahlten; bei der Kontrollprobe 77 %.

Versuch 96. 36stündig gequellter Weizen. Wurzellänge 4 mm. 10 vol.-proz. Verdünnung des offizinellen Präparats. Bestrahlung nach der 6. Minute der Vergiftung. Gesamtvergiftungsdauer $8\frac{1}{2}$ Minuten. Dosis 8 H. (16 cm).

Nach 13 Tagen Wurzellängen (Wasserkultur):

Hauptprobe: Unbestrahlt: 103; 86; 94; 100; 90; 74 (Mittel 91 mm).

Bestrahlt: 62; 45; 48; 51; 56; 59; 49 (Mittel 53 mm = 58 %).

Kontrollprobe: Unbestrahlt: 94; 102; 102; 100; 57; 89 (Mittel 90 mm).

Bestrahlt: 69; 75; 106; 77; 66; 55; 78 (Mittel 76 mm = 84 %).

An den oberirdischen Teilen zeigte sich kein Unterschied in der Empfindlichkeit beider Proben bei diesen zwei Versuchen.

In beiden Versuchen zeigt sich also die Wurzel der vergifteten Probe stärker durch die Strahleneinwirkung geschädigt als jene der Vergleichsprobe.

Sodann habe ich 28 Versuche an Weizen und Roggen angestellt, welche sämtlich in der zweiten Versuchsanordnung ausgeführt wurden.

Zunächst wurde in einer Serie von zehn Versuchen (von denen einzelne auf Tabelle I wiedergegeben sind) in der gewohnten Weise vorgegangen, indem außer der Haupt- und Kontrollprobe auch eine unbestrahlte, aber gleichlange mit H_2O_2 behandelte Probe gezüchtet wurde, wodurch es also möglich gemacht ist, den Schädigungseffekt beider Proben (der vorbehandelten Haupt- und der nachbehandelten Kontrollprobe) zu vergleichen. Eine nächste Versuchsreihe von 17 Versuchen (zum Teil auf Tabelle II wiedergegeben) wurde lediglich zu dem Zwecke ausgeführt, zur eigenen Orientierung ein Urteil darüber zu gewinnen, in welchem Ausmaße der oben beschriebene Sensibilisierungsbefund reproduzierbar ist. Zu diesem Zwecke war natürlich nur ein Vergleich der *Größe* der Haupt- und Kontrollprobe (nicht ihres Schädigungseffekts) notwendig. Ich habe

daher, um behufs möglicher Ausschaltung der individuellen Empfindlichkeitsdifferenzen alles verfügbare Pflanzenmaterial eines Versuchs den beiden Vergleichsreihen (Haupt- und Kontrollprobe) zuführen zu können, auf die Anlage einer dritten Reihe (unbestrahlte vergiftete Exemplare) verzichtet. Die Versuche gewähren daher nur eine unvollkommene Vorstellung über den *Grad* der Sensibilisierung, aber sie belehren desto eindringlicher über ihr Vorkommen (und über die Häufigkeit in der Reihe).

Im folgenden soll nun zunächst ein Teil dieser Versuche in Tabelle I und II ausführlich wiedergegeben werden. Über den Rest der Versuchsreihen wird sodann in Zusammenfassung Bericht erstattet werden (S. 373).

Die hier verwendeten Weizen- und Roggensorten waren durchweg als besonders brauchbar befunden. Für die Roggenversuche war bei Versuch 101 bis 103 Ernte reiner Linie, für die übrigen einheitliche Ernte eines Feldes in Verwendung gekommen. Die Weizenproben waren Handelsware. Die Notwendigkeit, behufs Erzielung gerader Wurzeln schmalkörnige Sorten zu bevorzugen, ließ die mir zu Gebote stehenden reinrassigen Sorten ausgeschlossen erscheinen. Die Probe arbeitete besonders gleichmäßig.

Zur Vergiftung wurden die in den bezüglichen Spalten der Tabellen angegebenen Konzentrationen von H_2O_2 verwendet, welche (ohne Titration) durch Verdünnung des officinellen 10proz. Präparats erhalten wurden. Die Vergiftung fand in Schalen, die Bestrahlung bei kleinen Wurzellängen im Schälchen, bei größeren auf der Glasplatte statt (s. Technische Bemerkungen, S. 361).

Eine Kontrolle der aus den Bedingungen der Exposition und der Ausdosierung der verwendeten Röhre geschätzten Röntgendosis durch *Holzkecht-Sabourand*-Tabletten fand nur bei der ersten Reihe statt. Bei der zweiten wurde dies unterlassen, um die zur Manipulation bei der Übertragung der Keimlinge zur Verfügung stehende Zeit nicht zu schmälern. Die Versuchsprotokolle zeigen, daß der Zweck der Dosierung, eine leicht schädigende Dosis zu verabfolgen, stets erreicht wurde.

Zur Anzucht der Keimpflanzen wurde absichtlich teils Wasserkultur, teils Sägespäne-, Fließpapier- und Erdekultur (lockere, fein zerriebene Gartenerde in Schalen) verwendet, um mit *einer* Behandlungsweise verbundene Zufälligkeiten auszuschließen.

Die in den letzten zwei bzw. drei Stäben der Tabellen angeführten freien Zahlen beziehen sich auf Wurzellängen. Wo auch die Längen der oberirdischen Teile in die Tabelle aufgenommen sind, stehen sie hinter den ersten in Klammern.

Um zu prüfen, ob der in den obigen Versuchen beobachtete Effekt auch an *kürzere Zeit gequellten Samen* zu konstatieren ist, wurde nachstehender Versuch ausgeführt.

Versuch 114. 17 Stunden in Wasser (offene Schale) gequellter Weizen wird auf 4 Stunden in ein Keimbett aus Filtrierpapier übertragen und dann bestrahlt (keine Wurzelanlage sichtbar). Ein Teil davon war mit 1proz. H_2O_2 -Lösung durch 24 Minuten vorbehandelt worden, der andere wurde ebensolange nachbehandelt. Dosis 20 H (20 cm) Sägespänekultur.

Länge der Wurzeln nach 7 Tagen:

Vorbehandelte Probe: 68; 53; 40; 62; 63; 76; 79; 67; 85; 78; 87; 93; 65; 69; 62; 64; 63; 60; Mittel 68 mm.

Nachbehandelte Probe: 103; 110; 105; 102; 118; 114; 107; 117; 98; 112; 113; 114; 109; 101; 81; 119; 77; 73; Mittel 104 mm. Auch die Blatt-

Versuchszahl, Versuchstechnik	Länge der vorbehandelten bestrahlten Probe: Wurzel (Blatt) 7 bis 12 Tage nach der Be- strahlung	Länge der nachbehandelten bestrahlten Probe: Wurzel (Blatt)	Länge der unbestrahlten Probe: Wurzel (Blatt)
Versuch e Roggen, 48 Std., Wurzel 4 mm, 0,7% H ₂ O ₂ 15', 5 H, (16 cm) Sägesp.	24 (28); 17 (22); 23 (35); 32 (38); 23 (31); 25 (35); 25 (30); 22 (25); 22 (35) Mittel: 23 (31) mm = 14°/o (31°/o)	100 (105); 80 (90); 71 (68); 58 (80); 68 (91); 80 (87); 86 (79); 100 (98); 83 (84); 38 (99); Mittel: 76 (88) mm = 48°/o (88°/o)	100 (78); 125 (101); 160 (94); 180 (108); 164 (100); 155 (87); 198 (106); 140 (105); 172 (108); 163 (111) Mittel: 155 (100) mm
Versuch e Roggen, 48 Std., Wurzel 4 mm, 0,7% H ₂ O ₂ 16', 3,5 H, (16 cm) Sägesp.	42 (53); 28 (35); 22 (33); 33 (51); 30 (44); 28 (43); 18 (36); 23 (37); 28 (28); 20 (33) Mittel: 27 (39) mm = 17°/o (42°/o)	75 (78); 159 (110); 118 (110); 122 (90); 95 (100); 110 (90); 125 (87); 127 (84); 81 (91); 123 (88); 93 (70) Mittel: 110 (90) mm = 77°/o (99°/o)	139 (98); 155 (85); 170 (104); 135 (78); 150 (98); 174 (95); 167 (108); 167 (108); 174 (97); 161 (102); 138 (90) Mittel: 157 (90) mm
Versuch k Roggen, 32 Std., Wurzel 4 mm, 4,5% H ₂ O ₂ 25', 4,5 H, (16 cm) Erde	43 (48); 31 (40); 39 (53); 35 (51); 25 (31); 31 (44); 39 (62); 41 (59); 45 (57); 22 (42); 61 (62); 42 (23); 30 (41); 27 (30) Mittel: 36 (43) mm = 31°/o (43°/o)	120 (113); 108 (103); 90 (110); 127 (127); 137 (117); 100 (120); 74 (108); 105 (138); 94 (96); 65 (67); 59 (105); 41 (52); 54 (56) Mittel: 99 (110) mm = 78°/o (102°/o)	127 (127); 143 (103); 112 (97); 109 (97); 118 (94); 85 (74) Mittel: 115 (99) mm
Versuch l Roggen, 32 Std., Wurzel 5 mm, 2% H ₂ O ₂ 15', 4 H, (16 cm) Erde	52 (65); 45 (60); 65 (90); 45 (47); 50 (50); 35 (52); 55 (70); 35 (56); 47 (60); 27 (52); 29 (48) Mittel: 44 (59) mm = 35°/o (50°/o)	122 (122); 127 (128); 130 (108); 87 (121); 124 (128); 118 (137); 102 (138); 117 (117); 77 (130) Mittel: 113 (125) mm = 91°/o (106°/o)	104 (128); 147 (143); 90 (123); 85 (107); 128 (148); 123 (116); 155 (102); 157 (71) Mittel: 123 (117) mm
Versuch m Roggen, 40 Std., Wurzel 7 mm, 1,5% H ₂ O ₂ 22', 4 H, (16 cm) Fließpapier	46; 18; 30; 29; 35; 37; 18; 34; 14; 26; 35; 22; 20; 20 Mittel: 27 mm = 25°/o	73; 27; 39; 50; 34; 46; 55; 60; 65; 60; 33; 33 Mittel: 48 mm = 43°/o	132; 93; 109; 116; 99; 99 Mittel: 88 mm
Versuch f Roggen, 48 Std., Wurzel 3 mm, 0,7% H ₂ O ₂ 15', 3,5 H, (16 cm) Sägesp.	72; 50; 100; 90; 95; 75; 85; 95; 66; 52; 72 Mittel: 77 mm = 45°/o	73; 130; 132; 117; 135; 112; 195; 148; 134; 98 Mittel: 127 mm = 74°/o	156; 190; 162; 200; 161; 170; 163 Mittel: 171 mm
Versuch o Weizen, 52 Std., Wurzel 8 mm, 1% H ₂ O ₂ 15', 6,5 H, (16 cm) Erde	70; 48; 76; 64; 57; 53; 49; 49; 31 Mittel: 55 mm = 55°/o	93; 72; 113; 72; 77; 72; 119; 67; 98; 83 Mittel: 86 mm = 86°/o	105; 81; 119; 90; 106 Mittel: 100 mm

¹⁾ Die ausführliche Wiedergabe einer so großen Zahl von Versuchen und die anschließende umständliche Diskussion ist durch die Eigenart der Versuchsmethode geboten, seit Th. Pfeiffer (20) (Landw. Versuchsstat. 86, 35) gezeigt hat, welchen Fehlschlüssen man sonst ausgesetzt sein kann.

Tabelle II¹⁾.

Ver- suchs- zahl (Kultur)	Spezies Quellungs- zeit	Wur- zel- länge	Konzen- tration	Ein- wirkungs- zeit	Bestrahlungs- dosis	Wurzellängen (bzw. Blattlängen) der Haupt- probe (vorbehandelt) 7 bis 12 Tage nach der Bestrahlung	Wurzellängen (bzw. Blattlängen) der Kontroll- probe (nachbehandelt) 7 bis 12 Tage nach der Bestrahlung
101 S.	Roggen 36 Std.	5 mm	1 %	13'	etwa 4 H (16 cm)	74; 72; 59; 65; 61; 50; 54; 58; 59; 50 Mittel: 60 mm	93; 97; 97; 73; 85; 81; 95; 88 Mittel: 88 mm
102 S.	Roggen 36 Std.	3 mm	1 %	13'	etwa 4 H (16 cm)	39(32); 31(40); 30(18); 39(43); 39(43); 29(44); 34(47); 33(41); 31(24); 33(43); 33(30); 42(33); 30(28) Mittel: 34 (35) mm	101(107); 102(102); 85(90); 69(97); 44(53); 89(77); 55(88); 39(35); 46(44); 68(88); 47(37); 57(63) Mittel: 66 (73) mm
103 W.	Roggen 36 Std.	1 mm	1 %	15'	etwa 4 H (16 cm)	47(48); 45(47); 37(47); 36(41); 35(53); 36(36); 42(50); 40(48); 33(42); 40(32); 35(30) Mittel: 38 (43) mm	66(58); 71(85); 97(66); 87(65); 91(91); 82(67); 82(76); 90(72); 73(58); 86(66); 83(57) Mittel: 82 (69) mm
71 W.	Weizen 36 Std.	13 mm	1 %	14'	etwa 8 H (20 cm)	41; 50; 32; 54; 55; 37; 36; 10; 37 Mittel: 39 mm	95; 89; 104; 115; 80; 91; 105; 103; 68; 129; 115 Mittel: 98 mm
67 W.	Weizen 60 Std.	10 mm	1 %	14'	etwa 10 H (etwa 16 cm)	38(38); 49(45); 40(40); 35(38); 50(52); 48(54); 46(43); 35(41); 59(33); 43(50) Mittel: 44 (39) mm	83(74); 100(89); 69(43); 57(83); 72(75); 82(72); 78(39); 68(61); 61(60); 69(35); Mittel: 74 (63) mm
109 S.	Weizen 48 Std.	7 mm	1 %	10'	etwa 6 H (16 cm)	33; 42; 40; 30; 30; 27; 29; 31; 47; 40; 47; 42; 13 Mittel: 35 mm	50; 81; 67; 55; 79; 46; 66; 82; 64; 76; 48; 48; 65 Mittel: 63 mm
54 W.	Weizen 60 Std.	8 mm	0,5 %	16'	9 H (20 cm)	42; 47; 28; 36; 27; 43; 38; 23; 45; 26; 46; 30 Mittel: 35 mm	51; 59; 48; 41; 86; 73; 101; 150; 78 Mittel: 76 mm
65 S.	Weizen 54 Std.	12 mm	1 %	12'	10 H (16 cm)	61(73); 64(45); 50(60); 50(59); 48(45); 43(90); 44(64); 55(59) Mittel: 51 (62) mm	53(146); 97(135); 102(130); 75(135); 145(127); 175(90); 133(92); 46(28) Mittel: 103 (110) mm
113 S.	Weizen 36 Std.	8 mm	1 %	10'	7 H (16 cm)	60(123); 66(108); 54(123); 73(103); 54(105); 48(97); 72(107); 68(105); 56(102) Mittel: 61 (97) mm	124(137); 114(117); 93(115); 79(118); 115(98); 96(135); 93(111); 98(127); 117(133) Mittel: 103 (121) mm

länge der vorbehandelten Probe war kleiner (Mittel 39) als die der Kontrollprobe (56).

Außer diesen ausführlich wiedergegebenen Versuchen enthalten die beiden erwähnten Versuchsreihen noch drei an Roggen und zehn an Weizen angestellte Versuche (mit einer durchschnittlichen Zahl von 11 Exemplaren pro Einzelserie eines Versuchs, also 22 bis 30 Exemplaren pro Versuch).

Bei diesen 13 Versuchen betrug die Länge der Wurzel der vorbehandelten Probe: 38, 42, 50 (zwei Versuche), 56, 67, 70, 76, 80, 85, 92, 95 und 97 % von der Wurzellänge der nachbehandelten Kontrollen. In den beiden letztgenannten Versuchen (95 und 97 %) wies eigentümlicherweise die Blattlänge deutliche Unterschiede zugunsten der Kontrollproben auf (die vorbehandelten Exemplare maßen 61 % der Kontrollen). Als durch die Vorbehandlung ganz unbeeinflusst fand sich somit die Empfindlichkeit der Exemplare nur in zwei Fällen, den beiden vorletzt angeführten (85 und 92 %) — unter einer Gesamtzahl von 30 Versuchen. *Bei keinem der Versuche war die Empfindlichkeit der Wurzeln der vorbehandelten Probe geringer als eine der Kontrollen.*

Weit weniger als bei der Wurzel zeigte sich begreiflicherweise die Empfindlichkeit der *oberirdischen Teile* durch die Vorbehandlung beeinflusst: unter den 30 Fällen war die Empfindlichkeit der oberirdischen Teile 18mal ganz unbeeinflusst geblieben, 16mal zeigte sich die vorbehandelte Probe deutlich empfindlicher, nur einmal *unempfindlicher* (um 10 %).

Bei den 16 Versuchen mit positivem Sensibilisierungsbefund betrug die Länge der Blätter der vorbehandelten Proben, ausgedrückt in Prozenten der Länge der Kontrollen: 35, 43 (zwei Versuche), 47, 50, 56, 59, 60, 61, (zwei Versuche), 62, 65 (zwei Versuche), 73 und 80 %.

Die Ausdehnung dieser Versuchsreihe auf 30 Einzelversuche verfolgte den Zweck, im Sinne der S. 362 zitierten Mahnung *Grafes* die Täuschungsmöglichkeiten, welche sich aus den individuellen Differenzen der Wachstums- und Empfindlichkeitsgröße ergeben, tunlichst einzuschränken. Bereits bei Betrachtung *eines einzigen* meiner Versuche (welche selbst bereits eine größere Anzahl absolut vergleichbarer Einzelobjekte umfassen) wird die Vorstellung, daß das Versuchsergebnis nur durch zufällige Verteilung individuell differenter Einzelproben vorgetäuscht sei, um so weniger Boden finden, als der Vergleich mit den Sauerstoffversuchen zeigt, wie willkürlich eine solche Annahme wäre. Derartige Versuche mit in die Augen springenden Differenzen zwischen der Haupt- und Kontrollreihe und verhältnismäßig geringen individuellen Differenzen innerhalb einer und derselben Reihe sind aber nicht vereinzelt, sondern eigentlich die Regel, und vereinzelt stehen die Fälle mit gleich stark geschädigter Haupt- und Kontrollprobe: in der großen Reihe nur zwei Fälle mit gänzlich unbeeinflusst gebliebener Empfindlichkeit! *Ganz besonders erschwert wird die Annahme, daß in den Einzelversuchen nur Zufälligkeiten der Verteilung individuell differenter Proben vorgelegen haben sollten, dadurch, daß in der ganzen Reihe an den Wurzeln nicht ein Fall von entgegengesetzter Verteilung (größerer Empfindlichkeit der Kontrollprobe) sich findet, und auch bei den aus anatomisch-physiologischen Gründen einer Beeinflussung durch Zusätze weniger ausgesetzten oberirdischen Teilen unter den 30 Fällen nur ein einziger sich findet, bei dem die Blätter der Hauptprobe um 10 % größer sind (ein noch in die Fehlerquellen fallender Betrag!) als jene der Kontrollen, während der gleiche Fall an der Wurzel das umgekehrte Verhalten in typischer Ausbildung zeigte.*

Es besteht somit keine Möglichkeit, die auffallenden Unterschiede in der Empfindlichkeit der vorbehandelten und nachbehandelten Proben durch Zufälligkeiten in der Verteilung individuell differenter Exemplare zu erklären, und *wir müssen* (trotzdem der Sensibilisierungsbefund sich nicht als unbedingt reproduzierbar erwiesen, sondern in nur 98 % unserer Versuche Bestätigung gefunden hat) unter Berücksichtigung der oben angeführten Momente *aus unseren Versuchen den Schluß ziehen, daß dem Hydroperoxyd die Fähigkeit zukommt, die Empfindlichkeit der verwendeten Gramineensorten¹⁾ in Zusatzversuchen zu erhöhen.*

Dabei zeigt die erste Versuchsreihe, welche auch gestattet, das Ausmaß der Schädigung der einzelnen Proben zu beurteilen, überdies, daß der Zusatz nicht nur eine bereits bestehende Empfindlichkeit quantitativ zu steigern vermag, sondern *daß er auch Organe für eine Dosis empfindlich zu machen vermag, auf welche sie ohne Zusatz gar nicht mit Wachstumsstörung reagieren*, wie sich an den Blättern der Roggenpflänzchen (Versuche e; k und l) zeigte, welche etwas unempfindlicher sind, als die Wurzeln der gleichen Pflanze, und daher auf die in diesen Versuchen verwendeten Dosen nicht ansprechen. Diese Vorbehandlung vermag also eine „Sensibilisierung“ im wörtlichen Sinne in die Wege zu leiten.

Da das in dieser Versuchsreihe verwendete offizinelle Wasserstoff-superoxydpräparat durch Schwefelsäurezusatz verunreinigt war, so habe ich weiterhin einige Versuche mit *Perhydrol Merck* (absolut säurefrei, chemisch rein) angestellt, welche den hier gewonnenen Befund vollkommen bestätigt haben und somit außer Zweifel stellen, daß die beobachtete Wirkung auf die Empfindlichkeit der Keimlinge *tatsächlich dem H_2O_2 selbst* zukomme.

Anschließend seien zwei Versuche wiedergegeben.

Versuch a. 48 Stunden gequellter Roggen. Wurzellänge 1 mm. Zweite Versuchsanordnung. Vorbehandlung (bzw. Nachbehandlung) mit 1,5 vol.-proz. Perhydrolösung durch 20 Minuten. Dosis (*Holzknicht-Sabouraud*) 4 H. (aus 17 cm Distanz).

Länge der Wurzeln (bzw. Blätter) nach 8 Tagen:

Hauptprobe (vorbehandelt): 29 (25); 29 (24); 39 (41); 30 (25); 26 (27); 19 (23); 23 (24); 26 (29); 24 (35); Mittel 27 (28) mm.

¹⁾ Wie meine Erfahrungen ergeben haben, ist der Erfolg von sensibilisierenden Maßnahmen auf verschiedene Spezies ein ungleicher. So gelang es mir nicht, mit der auf Gramineen wirksamen HCN bei Kresse und Lein sensibilisierende Wirkungen auszuüben. Bedenkt man die großen artlichen Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit sowie in der rein pharmakologischen Wirkung von Giften, ganz besonders aber die ungleiche Empfindlichkeit verschiedener Arten gegen Lichtgifte (Eosin!), sowie die vollkommene Unklarheit unserer Vorstellungen über die Wirkung der Lichtsensibilisatoren, so wird man in diesem Befund gewiß kein Argument gegen das Vorkommen von Sensibilisierungswirkungen überhaupt erblicken können.

Kontrollprobe (nachbehandelt): 59 (79); 95 (87); 130 (145); 99 (104); 155 (129); 130 (108); 134 (108); 118 (120); 130 (109); 134 (107); 69 (95); 43 (35); Mittel 107 (102) mm.

Versuch d. Roggen, 80stündige Quellung. Wurzellänge 1 mm. 24 Minuten währende Behandlung mit 2 vol.-proz. Perhydrollösung 3,5 H. (direkt gemessen) aus 17 cm Distanz.

Nach 7 Tagen:

Hauptprobe: 37 (50); 28 (40); 35 (52); 22 (41); 30 (30); 31 (43); 42 (45); 34 (33); 26 (25); 27 (22); 40 (46); Mittel 82 (88) mm.

Kontrollprobe: 104 (125); 86 (111); 100 (117); 122 (121); 101 (99); 44 (51); 85 (110); 68 (79); 84 (99); 43 (70); Mittel 88 (98) mm.

Das Gesamtergebnis unserer Versuche ist also, daß eine größere Zahl von geprüften Oxydationsmitteln sich unter den angegebenen Versuchsbedingungen als einflußlos auf die Empfindlichkeit von Keimlingen erwiesen haben, während bei einem derselben (H_2O_2), das durchaus nicht das stärkste von allen ist, die vorbehandelten Proben sich regelmäßig empfindlicher gezeigt haben.

Wenn wir nun in Berücksichtigung unserer eingangs aufgestellten Erwägungen über die Beweiskraft positiver und negativer Befunde zunächst auf jede Deutung verzichten und uns nur darauf beschränken, alle für ihre Erklärung in Betracht kommenden Momente in Erwägung zu ziehen, so ist die erste dabei auftauchende Frage wohl die, ob wir irgend etwas finden können, was uns den auffallenden Unterschied im Verhalten der verschiedenen geprüften Oxydationsmittel dem Verständnis näher zu bringen vermag.

Die als wirksam befundene Substanz — H_2O_2 — unterscheidet sich von den übrigen zunächst in physikalischer Hinsicht: *sie besitzt das niedrigste Molekulargewicht*; dementsprechend muß sie auch *das größte Diffusionsvermögen* von allen geprüften Substanzen besitzen. Bereits dadurch erscheint ihr Eindringen in die Zellen erleichtert. Bei manchen der übrigen Substanzen müssen aber auch die chemischen Eigenschaften ihrer Aufnahme ins Zellinnere hinderlich sein [so bei manchen eiweißfällenden Metallverbindungen sowie bei den Substanzen von hoher Affinität (Cl_2 , Br_2)]. Ganz besonders ist bei solchen Substanzen das Hineingelangen *in wirksamer Form* in Frage zu ziehen. Vom Peroxydsauerstoff wissen wir hingegen, daß er innerhalb der Zelle in *wirksamer Form* existenzfähig ist, sind doch *Peroxyde als normale Bestandteile der intakten, tätigen Zelle* nachgewiesen worden. Peroxydsauerstoff hat somit unter allen geprüften Substanzen die größte Aussicht den von uns eingangs aufgestellten Voraussetzungen für die Wirksamkeit gerecht zu werden: die Zellwände zu passieren und in wirksamer Form

und Konzentration im Plasma festgehalten zu werden und daselbst noch die speziellen Bedingungen seiner Wirksamkeit vorzufinden.

H_2O_2 ist zudem die einzige Substanz, bei deren Verwendung wir die erwähnte Rotfärbung der Wurzelspitzen beobachten konnten, also auch die einzige, bei der uns unsere Versuche einen sinnfälligen Beweis für das Eindringen des Zusatzes ins Innere in wirksamer Form erbracht haben. Ganz unabhängig von der Genese dieses Befundes und davon, ob zwischen ihm und der Strahlenreaktion irgendwelche Beziehungen bestehen, schafft er bereits als solcher einen Unterschied zwischen H_2O_2 und den anderen Substanzen, zeigt, daß das H_2O_2 bestimmte Wirkungen auf das Zellinnere ausübt, die die anderen Substanzen nicht hervorzubringen vermochten, und verleiht so unseren eben dargelegten Erwägungen eine gewisse experimentelle Stütze.

Wenn demnach also auch die Möglichkeit gegeben ist, den auffallenden Unterschied im Verhalten des H_2O_2 und der übrigen Oxydationsmittel durch seine besonders große Eignung zum Eindringen in die Gewebe zu erklären und wenn wir danach annehmen können, daß Oxydationsmittel überhaupt prinzipiell imstande sein können, die Röntgenreaktion zu sensibilisieren, wofern sie nur in unzersetzter Form und wirksamer Konzentration ins Gewebe zu gelangen vermögen, so dürfen wir diesen Schluß dennoch nur mit größter Vorsicht zu Folgerungen über Natur und Wesenheit der Reaktion verwerten, denn wie wir oben (S. 366) sahen, schafft die Milieuänderung durch einen Zusatz keine so eindeutige Variation der Versuchsbedingungen wie etwa eine weitgehende Änderung der Außentemperatur und dementsprechend können wir aus unseren Befunden keine derartige unmittelbaren Schlüsse ziehen, wie sie aus dem Fehlen eines Temperaturkoeffizienten der Röntgenreaktion gezogen werden konnten.

Gerade für H_2O_2 hat *Bach* (20) an einem konkreten Beispiel (l. c., S. 110) gezeigt, daß die Beschleunigung einer Reaktion durch H_2O_2 -Zusatz kein Beweis einer unmittelbaren Anteilnahme des Zusatzes an der Reaktion selbst sein muß, sondern auch durch Zerstörung eines Hemmungskörpers der Reaktion durch H_2O_2 zustande kommen kann. Etwas Ähnliches könnte auch bei unserem Befunde in Betracht kommen. So ließe sich auch ein Ineinandergreifen einer rein spaltenden und einer oxydativen Reaktion vorstellen, deren letztere die Reaktionsprodukte der ersteren entfernt. (Siehe z. B. die Verhältnisse bei den Purinfermenten, ein für die Röntgenreaktion konstitutionell-chemisch sehr naheliegendes Beispiel.)

Ich möchte daher aus diesem Befunde *allein* keine weitgehenden Schlüsse ziehen und mit der Verwertung desselben für die Erkenntnis der Wesenheit der Reaktion warten, bis weitere bestätigende Befunde mit andersartigen Versuchsanordnungen vorliegen. Aber gerade in heuristischer Hinsicht hat sich unser Ergebnis als besonders wertvoller Wegweiser für weitere Fragestellungen erwiesen. Denn dasselbe besitzt

auch eine gewisse physiologische Bedeutung. Die Peroxydgruppe ist nicht als vollkommen körperfremd zu betrachten: ihre regelmäßige Anwesenheit im normal atmenden Gewebe — als physiologisch wirksames (aktives) Umwandlungsprodukt des inerten Luftsauerstoffs — ist durch *Bach* äußerst wahrscheinlich gemacht; und in diesem Zusammenhang ist es sicher besonders interessant, daß wir das körpereigene Oxydationsmittel als Röntgensensibilisator befunden haben, denn es ergibt sich daraus die Frage, ob denn diesen im atmenden Gewebe als gegenwärtig anzunehmenden Sensibilisatoren nicht irgend eine Bedeutung für das Zustandekommen der spezifischen Empfindlichkeit der einzelnen Gewebe zukomme. Und wenn wir weiter bedenken, daß diese hoch aktive Atomgruppe voraussichtlich bei Erstickung der Gewebe rasch verschwinden dürfte, so gelangen wir zum Ausgangspunkt unserer Betrachtungen, den *Schwarzschen* Hautkompressionsversuch zurück: es liegt nahe, die von *Schwarz* beobachtete Desensibilisierung komprimierter Haut auf das Verschwinden dieses Sensibilisators zurückzuführen, und unsere Versuche würden dann gewissermaßen ein Gegenstück zum *Schwarzschen* Versuch darstellen.

Dadurch wird der Wunsch rege, in noch unmittelbarer Weise bei der Pflanze die beim *Schwarzschen* Versuch gegebenen Verhältnisse nachzuahmen, nämlich direkt zu prüfen, *ob auch bei der Pflanze eine wirksame und ausgiebige Behinderung der durch die Anwesenheit molekularen Sauerstoffs gegebenen Oxydationsmöglichkeiten eine Herabsetzung der Röntgenempfindlichkeit der Zellen im Gefolge hat.* Ich habe daher auf meine, l. c., mitgeteilten Versuche, den Einfluß sauerstofffreier Umgebung auf die Empfindlichkeit der Pflanzen festzustellen, zurückgegriffen, und zwar verwandte ich nunmehr die Verdrängung der Luft durch Kohlensäurestrom¹⁾. Die Keimlinge wurden in der oben geschilderten bei den Sauerstoffversuchen verwendeten Bestrahlungsröhre einem Kohlensäurestrom (der vorher je eine Waschflasche mit Na_2CO_3 und mit KMnO_4 passiert hatte) ausgesetzt und gleichzeitig mit vergleichbaren in atmosphärischer Luft befindlichen Kontrollobjekten bestrahlt.

Kohlensäure ist in der vorliegenden Frage allerdings nicht als chemisch indifferentes Gas zu betrachten, da die Erhöhung ihres Partialdrucks in der Umgebung die Abgabe aus den Geweben hemmen und dies durch Rückstauung entsprechend dem Massenwirkungsgesetz eine weitere Hemmung der Oxydationsvorgänge bedingen muß. Immerhin kann die Anwendung des Gases als gute Imitation der Vorgänge bei der Erstickung dienen.

¹⁾ Erzeugt aus Marmor und halb verdünnter roher Salzsäure in der oben benutzten Gasentwicklungsflasche von *Lumière* und *Seyewetz*. Regulierung des Gasstroms am Scheidetrichterhahn.

Dabei zeigte sich tatsächlich eine starke desensibilisierende Wirkung dieser Versuchsanordnung.

Versuch 1. Weizen reiner Linie (Krottendorf). 48stündige Quellung. Zwei Proben: a) Wurzellänge 6 bis 7 mm, b) 8 mm. Von beiden Proben Exemplare teils im Sauerstoffstrom, teils in atmosphärischer Luft bestrahlt. Ein dritter Teil wird unbestrahlt gelassen. Dieser und die in atmosphärischer Luft bestrahlten Kontrollen werden nachträglich gleichlang dem Kohlensäurestrom ausgesetzt. Bei allen Versuchen etwa 200 Blasen pro Minute. Beginn der Bestrahlung 20 Minuten nach Beginn der Gasentwicklung. Vorher wurde bei diesem und allen anderen Versuchen stets der Austritt des Gases aus dem beim Fenster hinausgeleiteten Ableitungsschlauch (Barytwasser, Zündholz) nachgewiesen. Gesamtdauer der Gasentwicklung 34 Minuten. Distanz 20 cm. Dosis 9 H. (*Sabouraud*, Hauptprobe und Kontrollprobe stets in peinlich gleichgehaltener Distanz von der Röhre.)

Länge der Exemplare nach 16 Tagen:

Unbestrahlt: 77; 167; 112; 93; 116; 101; Mittel 112 mm.

Im Kohlensäurestrom bestrahlte Probe: a) 120; 80; 100; 84; 88; 128; 76; 77; 44; 55; Mittel 85 mm = 76 %.

b) 130; 82; 108; 115; 107; 130; 107; 148; 113; 130; 90; 126; Mittel 115 mm = 102 %.

In Luft bestrahlte Probe: a) 27; 22; 22; 23; 26; 28; 28; 22; 22; 23; 28; 28; Mittel 25 mm = 22 %.

b) 23; 22; 28; 21; 22; 23; 22; 24; 22; 21; 22; 18; 22; 21; 17; Mittel 21 mm = 18 %.

Versuch 8. Weizen derselben Gattung. 48stündige Keimung. Wurzellänge 5 mm. Gleiche Anordnung („zweite Versuchsanordnung“). Vorbehandlung mit Gas 19 Minuten. Gesamtgasdauer 28 Minuten. Dosis 7 H aus 20 cm Distanz.

Nach 8 Tagen zeigen die Proben folgende Längen:

Unbestrahlt: 122; 127; 120; 81; 129; 115; 100; 117; 127; 115; Mittel 115 mm.

Im Kohlensäurestrom bestrahlt: 108; 120; 84; 103; 116; 123; 97; 123; 126; 116; 100; 102; 103; 71; 97; Mittel 106 mm = 92 %.

In Luft bestrahlt: 43; 67; 47; 42; 52; 43; 67; 52; 43; 69; 40; 39; 37; 34; 31; 24; Mittel 46 mm = 40 %.

Wie man sieht, wird bei Weizenkeimlingen die Wirkung einer die Kontrollen um 82 % ihrer Wachstumsenergie schädigende Dosis durch das Verweilen im Kohlensäurestrom während der Bestrahlung vollkommen aufgehoben.

Bei anderen Pflanzenspezies konnte durch diese Versuchsanordnung nur eine weitgehende Hemmung der Strahlenwirkung erzielt werden¹⁾.

¹⁾ Die bereits bei dieser rohen Versuchsanordnung zum Ausdruck kommende Tatsache, daß der neuartige, durch den Sauerstoffzutritt bedingte Einfluß auf die Empfindlichkeit nicht bei allen Arten den gleichen Anteil an der Empfindlichkeit der Objekte ausmacht, soll an ausgedehnterem Material verfolgt werden. Gleichzeitig wird auch das Verhalten verschiedener ontogenetischer Stadien eines Objekts geprüft werden (im Gange befindliche Versuche).

Versuch 6. Wicken von 58stündiger Keimung. Erste Versuchsanordnung mit Abdeckung der unbestrahlten Hauptprobe durch dreifache Lagen Müllerschutzstoff (Technik s. S. 364) und einem darübergelegten Sandsack. Wurzellängen: Hauptprobe 4 bis 5 mm, Kontrollprobe 6 bis 7 mm. Vorbehandlung mit Kohlensäure 23 Minuten. Gesamtdauer der Kohlensäurebehandlung 35 Minuten. Distanz 20 cm. Dosis 10 H.

Länge der Proben nach 7 Tagen¹⁾:

Hauptprobe: Unbestrahlt: 128; 142; 132; 135; 127; 130; 126; 135; 136; 138; 128; 150; 125; 128; 118; 106; Mittel 180 mm.

Bestrahlt: 90; 71; 81; 86; 89; 90; 98; 64; 66; 63; 65; 68; 64; 53; Mittel 75 mm = 57 %.

Kontrollprobe: Unbestrahlt: 154; 150; 136; 142; 173; 164; 168; 133; 159; 122; 130; 157; 145; 143; 168; Mittel 150 mm.

Bestrahlt: 16; 15; 17; 18; 17; 16; 14; 17; 15; 23; 15; 22; 13; 14; 16; 20; Mittel 16 mm = 11 %.

Versuch 4. Wicken des vierten Quellungstages. Zweite Versuchsanordnung. Wurzellänge 25 bis 28 mm. Gesamtversuchsdauer 34 Minuten. Bestrahlung 10 H aus 20 cm.

Länge der Proben nach 10 Tagen:

Unbestrahlte Probe: 188; 200; 196; 160; 175; 183; 160; Mittel 180 mm.

Bestrahlte Hauptprobe: 138; 83; 58; 46; 73; 117; 75; 63; 98; 106; Mittel 85 mm = 47 %.

Bestrahlte Kontrollprobe: 32; 26; 32; 30; 25; 43; 22; 72; 25; 32; Mittel 34 mm = 18 %.

Versuch 7. Linsen, 36stündige Quellung. Erste Versuchsanordnung. Wurzellängen beider Proben 1 mm. Vorvergasung 20 Minuten. Gesamtvergasungszeit 30 Minuten. Die Wurzeln waren durchweg nach oben zu (gegen die Röhre) ausgerichtet. (Die Wurzeln der Linsen gehen zumeist in spitzem Winkel vom Samen ab.) Entfernung 20 cm. Dosis 9 H.

¹⁾ Bei diesem und allen mit Wicken und Linsen ausgeführten Versuchen bot auch die Größe (Breite und Länge) des größten Blattes ein bequemes und zur raschen Orientierung geeignetes Mittel zur Beurteilung des Grades der Schädigung. Die hier versuchsweise vorgenommene Messung der Längen der größten Blätter ergab für die *beiden* unbestrahlten Proben übereinstimmend 10 bis 12 mm; für die bestrahlte Hauptprobe das arithmetische Mittel von 7,2 mm (die Proben schwankten zwischen 6 und 10 mm); für die bestrahlte Kontrollprobe das arithmetische Mittel von 1,5 mm (die Proben schwankten zwischen 0,3 und 3 mm). Bei Besichtigung erscheinen diese Befunde viel eindrucksvoller. Dies ist ein wesentlicher experimenteller Vorteil der Wicken und Linsen auch gegenüber anderen nahestehenderen Arten (Bohnen, Erbsen und Pferdebohnen), der besonders durch äußerst frühzeitiges Auftreten dieser Unterschiede noch erhöht wird. Man erhält so bereits in den ersten Tagen ein grobes Bild über das Ergebnis. Offenbar besitzen die Blätter bei diesen beiden Arten eine besonders hohe relative Empfindlichkeit, ein Verhalten, welches verständlich wird, wenn man erwägt, daß auch die relative Empfindlichkeit der Wurzeln und oberirdischen Teile bei verschiedenen Arten verschieden ist: bei Linsen annähernd gleichgroß, bei Roggen Wurzelempfindlichkeit > Empfindlichkeit der oberirdischen Teile, während bei Weizen das Verhältnis umgekehrt ist. (Beide Befunde können aus meinen oben mitgeteilten Versuchsprotokollen abgelesen werden.)

Länge der Proben nach 10 Tagen:

Hauptprobe: Unbestrahlt: 115; 127; 120; 118; 106; 118; 107; 119; 117; 102; 88; 132; 132; 122; 128; 122; Mittel 117 mm.

Bestrahlt: 99; 67; 84; 85; 85; 95; 97; 91; 79; 109; 86; 107; 83; 57; 60; 77; Mittel 85 mm = 72 %.

Kontrollprobe: Unbestrahlt: 134; 149; 140; 136; 138; 137; 135; 123; 136; 155; 136; 139; 102; 120; 131; 119; 115; Mittel 132 mm.

Bestrahlt: 29; 18; 36; 39; 35; 18; 23; 51; 16; 40; 22; 21; 21; 14; 15; 17; Mittel 25 mm = 19 %.

Es spricht sich also auch in diesen Versuchen eine *weitgehende Herabsetzung der Empfindlichkeit der im Kohlensäurestrom bestrahlten Probe* aus; wenngleich die Höhe der Dosis hier bereits ausreicht, um auch diese Probe noch zu schädigen. Da somit diese Versuchsanordnung die Empfindlichkeit der Proben nicht vollständig vernichtet sondern nur herabsetzt, so war zu erwarten, daß es bei Steigerung der Dosis möglich wäre, über die Grenze dieser Schutzwirkung der Kohlensäure hinaus zu gelangen, also zu einer Dosis, bei welcher kein Unterschied mehr besteht zwischen der Empfindlichkeit der in atmosphärischer Luft bestrahlten Probe und jener der Kohlensäureprobe. Das war auch tatsächlich der Fall.

Versuch 3. Wicken des vierten Quellungstages. Zweite Versuchsanordnung. Wurzellänge 30 mm. Kohlensäurebehandlung von 31 Minuten Dauer. Distanz 20 cm. Dosis 22 H.

Länge der Proben nach 10 Tagen:

Unbestrahlt: Mittel von acht gut stimmenden Exemplaren 147.

Bestrahlte Hauptprobe: Mittel von zehn gut stimmenden Exemplaren 24 = 16 %.

Bestrahlte Kontrollprobe: Mittel von neun gut stimmenden Exemplaren 28,7 = 15,7 %.

Wir können also die Ergebnisse der Versuchsreihe folgendermaßen zusammenfassen: Ersatz der atmosphärischen Luft durch Kohlensäure setzt die Empfindlichkeit der Keimlinge für mittlere Dosen weitgehend, bei Weizen sogar bis zum Ausbleiben jeder Strahlenwirkung herab. Hohe Dosen schädigen die differente Probe ebenso wie die Kontrolle. Die Strahlenempfindlichkeit wird also durch diese Behandlung schwer beeinträchtigt aber nicht vollkommen vernichtet¹⁾.

Durch diese Versuchsreihe ist es somit gelungen, den Schwarzschen Versuch bei Pflanzen ganz unmittelbarweise nachzuahmen: eine Imitation des Erstickungsvorgangs setzt auch bei pflanzlichen Objekten die

¹⁾ Daß Herstellung anoxybiotischer Bedingungen die Empfindlichkeit nicht ganz aufhebt, ersieht man besser als aus diesen zu kurz dauernden Versuchen aus meinem Versuch 31 der ersten Mitteilung (S. 42), dessen 21stündige Dauer wohl zur restlosen Entfernung des im Gewebe befindlichen molekularen Sauerstoffs ausgereicht haben dürfte.

Empfindlichkeit bedeutend herab; dadurch wird es mehr als wahrscheinlich gemacht, daß das wirksame Moment auch beim *Schwarzschen* Versuch in den beiden Versuchsanordnungen gemeinsamen Bedingungen des *Gaswechsels* gelegen sei.

Wenn wir aber versuchen wollen, dabei zu konkreteren chemischen Vorstellungen über den Zusammenhang des Sauerstoffmangels mit der Desensibilisierung zu gelangen, so stoßen wir auf mehrfache Schwierigkeiten. Am nächsten wäre es, an im molekularen Sauerstoff erfolgende Verbrennungen oder, besser noch, an Lichtreaktionen oxydativen Charakters anzuknüpfen, welche auf Kosten des Luftsauerstoffs verlaufen und dementsprechend in ihrem Ablauf vom Partialdruck dieses Gases bestimmt werden, z. B. die Eosinlichtwirkungen. *Die Analogie der Röntgenreaktion mit diesem Vorgange ist aber eine äußerst unvollkommene*, denn der Einfluß der Sauerstoffkonzentration äußert sich bei der Röntgenreaktion viel weniger durchgreifend und nur in einem sehr beschränkten Konzentrationsintervall: vor allem hemmt absoluter Sauerstoffmangel die Röntgenreaktion nicht vollkommen (wie es bei Eosin der Fall ist), ferner erhöht Vermehrung der Konzentration über den in der Atmosphäre gegebenen Partialdruck (Sauerstoffstrom) die Empfindlichkeit nicht. *Es erweist sich also lediglich der zwischen dem atmosphärischen Sauerstoffdruck und dem Nullwert gelegene Konzentrationsprung als ausschlaggebend für die Empfindlichkeit.*

Die Analogie mit der Eosinlichtwirkung ist somit nicht geeignet, die Erscheinungen zu erklären, und *es fragt sich überhaupt, ob wir für die Erklärung mit den für reine photochemische Reaktionen maßgebenden, in den Affinitäten des unbelebten Substrats begründeten Momenten das Auslangen finden, welche sich bisher entgegen unseren wiederholt ausgesprochenen¹⁾ Erwartungen überraschenderweise als allein maßgebend für die Größe der Empfindlichkeit erwiesen hatten*; und ganz besonders der eine Umstand, daß sich ausschließlich jener Konzentrationsprung, der den Unterschied in den Bedingungen der Oxybiose und der Anoxybiose beinhaltet, der also (als einziger von den von mir experimentell geprüften) die Stoffwechselvorgänge der Keimlinge so tiefgehend beeinflusst, sich als maßgebend für die Empfindlichkeit erwiesen hat, läßt daran denken, daß das eigentlich wirksame Moment in unseren Versuchen *nicht von der Konzentration molekularen Sauerstoffs dargestellt wird, sondern daß zwischen der Sauerstoffkonzentration und dem Lichtvorgang noch irgend eine biologisches Moment eingeschaltet ist*, dessen eigene Entstehungs- und Wirksamkeitsbedingungen in unseren Versuchsergebnissen mit zum Ausdruck kommen. Denn man gewinnt aus den Ergebnissen den Eindruck, daß sich bei der Sauerstoffatmung im Gewebe eine für den Ablauf der Röntgenreaktion bedeutungsvolle (diese unterhaltende oder fördernde) Substanz bildet, welche in der intramolekular atmenden Pflanze fehlt, oder in geringerer Menge vorhanden ist; und es liegt nahe, dabei an die physiologischen Gewebesperoxyde zu denken: vielleicht handelt es sich dann also um eine intramolekular verlaufende oxydative Lichtreaktion nach Art der *Ederschen*, deren Sauerstoffspender Peroxyde sind, also um *eine photochemische Oxydation eines lichtempfindlichen Gewebbestandteiles auf Kosten von Peroxydsauerstoff, und*

¹⁾ Erste Mitteilung S. 25; zweite Mitteilung S. 352; Z. 5 bis 16 und 21 bis 25.

unser Versuchsergebnis könnte darum der Ausdruck dafür sein, daß den physiologischen Peroxydgruppen der Gewebe in der Tat die gleiche sensibilisierende Wirkung auf die Röntgenreaktion zukommt wie zugesetzten Peroxydgruppen und daß ihnen somit auch ein gewisser Anteil am Zustandekommen der normalen Empfindlichkeit zufällt, dessen Wegfall infolge Verschwindens der Gruppen bei der Erstickung das Desensibilisierungsphänomen in den eben in Diskussion stehenden eigenen Versuchen und im Kompressionsversuch Schwarz erklären würde: die Empfindlichkeit gleichartiger Objekte gleichen Entwicklungsstadiums ließe sich dann als Funktion des Peroxydgehalts der empfindlichen Zellen darstellen. Damit wäre vielleicht auch eine Möglichkeit gegeben (s. S. 356) zu verstehen, wieso die den „Atmungsvorgang“ (in toto) weit intensiver hemmende Blausäurevergiftung die Empfindlichkeit nicht ebenfalls herabsetzt, sondern im Gegenteil erhöht (Anreicherung von Peroxyden infolge einseitiger Lähmung der Peroxyde zerstörenden Katalase durch das Gift *Wo. Ostwald*, l. c.). Über die Berechtigung dieses ganzen Erklärungsversuchs müssen indessen erst weitere Untersuchungen entscheiden. Derzeit kann er nicht mehr Geltung beanspruchen als eine der S. 357 bis 358 angeführten Möglichkeiten zur Erklärung der Cyanwirkung.

Wie nun auch die spezielle Mechanik dieses Zusammenhangs zwischen der Reaktion und der Sauerstoffversorgung der Gewebe beschaffen sein mag: das Bestehen eines solchen Zusammenhangs überhaupt wird durch unsere beiden Versuchsreihen in hohem Grade wahrscheinlich gemacht. Die Förderung einer Reaktion durch ein Oxydationsmittel von hohem Sauerstoffpotential und die Hemmung der gleichen Reaktion durch Sauerstoffmangel würden wohl in der Auffassung, daß die Reaktion unter Beteiligung von Sauerstoff verläuft, die ungezwungenste Erklärung finden ¹⁾.

¹⁾ Würde die Reaktion an einem bekannten, und in beliebiger Menge in reinem Zustande zugänglichen Substrate ablaufen, so wäre die definitive Entscheidung dieser Frage durch den Nachweis von CO₂ unter den Reaktionsprodukten zu erbringen. Bei der vorliegenden biologischen Reaktion wissen wir aber nicht, in welcher Zahl und welchen Mengenverhältnissen sich die Gewebsbestandteile an der Reaktion beteiligen. Die Möglichkeit, daß der empfindliche Zellbestandteil eine fermentartige Substanz sein kann (seine Umsetzungsprodukte also nicht quantitativ faßbar zu sein brauchen), nimmt dem negativen Befund jede Beweiskraft; der positive aber wird durch den Umstand entwertet, daß mehrere Zellbestandteile unter dem Lichteinfluß in Reaktion treten können, wobei es nicht ausgeschlossen ist, daß nur ein Teil dieser Reaktionen oxydativ verläuft. Wenn auch letztere Möglichkeit nicht sehr naheliegt, so ist doch für den positiven Befund weiterhin besonders störend, daß im Gewebe durch die Atemvorgänge fortwährend Bedingungen zur spontanen Kohlensäurebildung gegeben sind; und diese Kohlensäurebildung kann durch unsere Versuchsanordnung (durch Strahlenwirkung oder durch Temperatureinflüsse) im positiven oder negativen Sinne beeinflusst werden. Vielleicht läßt sich hierbei die jetzt gegebene Möglichkeit, die Lichtreaktion vom Atemvorgang (durch tiefe Temperaturen, Trockenheit des Substrats oder Cyanwirkung) weitgehend zu trennen, experimentell ausnutzen.

Die durch die vorliegenden Versuche nahegelegte Auffassung, daß die Reaktion zu den mit Ladungsänderung einhergehenden zu zählen ist, wird aber auch ohne eine solche Bestätigung um so weniger auf Schwierigkeiten stoßen, als sie sich auf eine Reihe von chemischen und biologischen Tatsachen stützen kann, welche diesen Charakter der Reaktion voraussehen ließen (siehe Einleitung und I. Mitteilung S. 25 und 39 bis 43) und mich zur Inangriffnahme der ganzen Versuchsreihe veranlaßt haben: vor allem die große Häufigkeit von Oxydationsvorgängen unter den Lichtreaktionen *überhaupt* (für welche wohl die geistvolle Arbeitshypothese *Winklers*, die die Oxydationsnatur der Lichtreaktionen sogar zum Ausgangspunkt seines Erklärungsversuchs des Zusammenhangs der physikalischen und chemischen Vorgänge macht, das beredteste Zeugnis ablegt), sodann aber die besondere Häufigkeit von Oxydationsvorgängen unter jenen Lichtreaktionen, *bei denen Körperbestandteile zerstört werden* (siehe I. Mitteilung S. 25): Lichtreaktionen organischer Säuren, die umfangreichen Metallkatalysen *Neubergs*, Lichtschädigung von Fermenten (*Invertin*), *Tappeiners* photodynamische Vorgänge, Lichtschädigung von Bakterien und tierischem Gewebe und Gewebsbestandteilen.

Und diesen Vorgängen reiht sich nun die Röntgenreaktion an. *Dadurch ist zwischen diesem in vieler Beziehung noch dunklem Vorgange und einer zum Teil ziemlich gut charakterisierten Gruppe von photochemischen Reaktionen der belebten und unbelebten Welt eine Brücke hergestellt*, welche ihre Tragfähigkeit zunächst wohl nur zu heuristischen Zwecken zu erweisen haben wird. Das Studium der Beeinflußbarkeit der Reaktion durch systematische Variation der durch das Milieu gegebenen Bedingungen hat sich also an diesem einen Beispiel als geeignet erwiesen, unsere Vorstellungen vom Wesen der Reaktion zu erweitern.

III. Schlußbetrachtungen.

Am Eingange zu dieser Untersuchung habe ich die Erwartung ausgesprochen, daß auch die innerhalb der lebenden Zellen ablaufenden photochemischen Reaktionen prinzipiell in ähnlicher Weise wie jene der unbelebten Welt einer Beeinflussung durch Zusätze von rein chemischer Wirksamkeit zugänglich sein müssen, und ich konnte mich dabei auf meinen seinerzeit an cyanvergifteten Keimlingen erhaltenen Zufallsbefund stützen. Dieser Befund steht nun nicht mehr vereinzelt da, denn wir haben im *Hydroperoxyd* eine Substanz von ähnlicher Sensibilisierungswirkung gefunden, die aber keinen Zufallsbefund darstellt, sondern zu der wir in planmäßiger Auswertung der derzeit herrschenden Vorstellungen über das Wesen der Lichtreaktionen gelangt sind.

HCN und H_2O_2 , diese beiden uns untergekommenen Sensitatoren, sind nun aus Komponenten von äußerst niedrigem Atomgewicht zu-

sammengesetzt, demzufolge sie in ihrem Absorptionsvermögen für Röntgenstrahlen noch merklich hinter die als Träger der Empfindlichkeit geltenden, Phosphor und Schwefel enthaltenden Kerneiweißkörper zu stehen kommen und daher nicht in der Lage wären, diese oder andere Zellbestandteile durch Erhöhung der Lichtabsorption optisch zu sensibilisieren. Wenn demnach rein physikalische Gesichtspunkte von der Erklärung des von uns beobachteten Sensibilisierungsvorgangs auscheiden müssen, so konnten wir bereits bei der Blausäurewirkung auf der Suche nach anderweitigen Erklärungsmöglichkeiten an der prägnanten chemischen Aktivität der Substanz um so weniger vorübergehen, als ihr die Fähigkeit zukommt, Pflanzen auch gegen aktinisches Licht zu sensibilisieren. Wenn schon die gleichzeitige Wirksamkeit innerhalb *verschiedener* Spektralbezirke nach den grundlegenden photochemischen Auffassungen (*Vogel*) nicht einem optischen, sondern einem chemischen Sensibilisator entspricht, so erhält dieser Umstand durch die weitgehende Verschiedenheit der Absorptionsgesetze in beiden Spektralbezirken (Molekularfunktion bzw. Atomfunktion!) ganz besonderes Gewicht, und *wir können die gemeinsame Ursache beider Sensibilisierungswirkungen der Blausäure daher nur in ihren chemischen Eigenschaften suchen*¹⁾.

In noch weit unmittelbarer Weise können wir aber bei der nunmehr aufgefundenen Sensibilisierungswirkung des Hydroperoxyds den Zusammenhang mit den gleichfalls prägnanten chemischen Eigenschaften der Substanz erkennen, nicht nur durch die Oxydationsnatur der Lichtreaktionen überhaupt, welche die sensibilisierenden Eigenschaften dieses Oxydationsmittels verstehen läßt, sondern in ganz direkter Weise durch die Ergebnisse unserer Kohlensäureversuche und durch eine Gegenüberstellung der Resultate beider Versuchsreihen: *beide Beeinflussungen* (H_2O_2 -Vergiftung und Kohlensäurestrom), *welche ein in der normal atmenden Zelle bestehendes Gleichgewicht nach entgegengesetzter Richtung verschieben, beeinflussen auch die Empfindlichkeit der Zelle in entgegengesetztem Sinne*.

Die von uns vorausgesehene prinzipielle Möglichkeit, die in der lebenden Zelle ablaufende Röntgenreaktion durch Zusätze von rein chemischer Wirksamkeit zu beeinflussen, ist durch diese Versuche tatsächlich bewiesen, und zugleich über Zufallsbefunde hinaus in den Bereich systematischer Erforschbarkeit gerückt, und es eröffnet sich die Aussicht, bei weiterer Ausdehnung solcher Versuche durch planmäßige Ausnutzung aller von der photochemischen Erfahrung dar-

¹⁾ Wenngleich der Mechanismus dieser Wirkung noch ungeklärt ist und eine direkte und unmittelbare Beziehung der Substanz selbst zu den Reaktionsteilnehmern nicht unbedingt sichergestellt ist, vielmehr ein Umweg über andere Zellbestandteile nicht ausgeschlossen werden kann (s. oben).

gebotenen Möglichkeiten den Kreis der Substanzen von sensibilisierender Wirksamkeit noch zu erweitern¹⁾, und es kann wohl keinem Zweifel unterliegen, daß die weitere Verfolgung dieses hier versuchsweise eingeschlagenen Weges auch von der Heranziehung konstitutionell-chemischer, physiologischer und pharmakologischer Gesichtspunkte eine wesentliche Förderung zu erwarten hat.

Die *Richtung* dieses Weges ist wohl durch die nunmehr wahrscheinlich gewordene *Oxydationsnatur der Reaktion vorgezeichnet*: und dies vermag die Aussichten solcher Versuche nur zu erhöhen; gehören doch die wirksamsten Lichtkatalysen der belebten wie der unbelebten Welt (fluoreszierende Farbstoffe, Metallkatalysen, alle Plattensensibilisierungen) gerade dieser Gruppe von Reaktionen zu. Ob aber solchen Bestrebungen auch ein voller *praktischer* Erfolg (eine in der Zelle hinreichend wirksame, ungiftige, leicht resorbierbare Substanz) beschieden sein werde, muß gleichwohl zweifelhaft erscheinen: welche Schwierigkeiten sich bei solchen Problemen noch auf der allerletzten Wegstrecke auftürmen können, zeigt das Beispiel der in vitro selbst auf Amöben so wirksamen Fluoresceinpräparate, welche aber im Körper des Warmblüters durch chemische Gegenkräfte beinahe vollkommen um den Erfolg gebracht werden!

Literatur.

- 1) *Unna-Golodetz*, „Biochemie der Haut“ in *Oppenheimers* Handbuch der Biochemie, Ergänzungsband. — 2) *Tischler*, Allgem. Pflanzenkaryologie in *Linsbauers* Handbuch der Pflanzenanatomie 2, 48. — 3) *Roloff*, Zeitschr. f. physikal. Chem. 18, 331. — 4) *Weigert*, Die chemischen Wirkungen des Lichtes, Stuttgart 1911, Enke. — 5) *Neuberg* und *Galambos*, Diese Zeitschr. 61, 305. — 6) *Czapek*, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl., Jena 1913. — 7) *Ostwald*, Diese Zeitschr. 6, 412. — 8) *Neuberg*, Ebendasselbst 29, 292 usw. — 9) *Downes* und *Blunt*, Proc. of the Roy. Soc. 1877. — 10) *Schwarz*, Mitt. a. d. Lab. f. rad. Diagn. Wien 2. — 11) *Grafe*, Ernährungsphysiolog. Praktikum, Berlin 1914. — 12) *Schaudinn*, Zeitschr. f. allg. Physiologie 2. — 13) *Perthes*, Deutsch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 17/18. — 14) *Jüngling*, Strahlentherapie 10, 502. — 15) *Winther*, Zeitschr. f. wiss. Photograph. 9, 7. — 16) *Wilcock*, Journ. of physiol. 1904, S. 440. — 17) *Zülzer*, Arch. f. Protistenkunde 1905, 5, 358. — 18) *Poizat-Seyewetz*, C. r. d. Acad. d. Scienc. 144, 86. — 19) *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Leipzig 1904. — 20) *Bach*, Oxydationsfermente, Wien 1910, Urban-Schwarzenberg. — 21) *Th. Pfeiffer*, Ldw. Versuchsstat. 86, 35.

¹⁾ Selbstverständlich kann bereits die Möglichkeit, durch Peroxyde sensibilisierende Wirkungen auszuüben, praktische Verwertung finden, vorausgesetzt, daß die Versuche am Tier (bzw. Menschen) überhaupt reproduzierbar sind. *Hydroperoxyd* allerdings muß wegen seiner unerwünschten Nebenreaktion mit der Gewebs- und Blutkatalase (Luftembolie) ungeeignet erscheinen. Es sind aber Versuche im Gange, um die Einwirkung anderer, der Katalasewirkung nicht unterworfenen Peroxyde und chemisch verwandter Substanzen auf die Empfindlichkeit zu prüfen.

Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen.

XXIV. Mitteilung¹⁾.

Kritisches über das Vorkommen der Citronensäure in den Pflanzen.

Von

Hartwig Franzen und Fritz Helwert.

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.)

(Eingegangen am 7. November 1922.)

Vor einiger Zeit konnte der eine von uns gemeinsam mit *Ernst Keyssner*¹⁾ zeigen, daß die allgemein verbreitete Ansicht, Äpfelsäure sei als ein im Pflanzenreich weit verbreiteter Körper nachgewiesen, nicht haltbar ist. Nur in verhältnismäßig wenig Pflanzen war ihr Vorkommen sichergestellt. In der gleichen Weise wie bei der Äpfelsäure haben wir nun auch die Literatur über das Vorkommen der Citronensäure in den Pflanzen, einschließlich einiger Pilze, einer kritischen Durchsicht unterzogen, um nur die sicher nachgewiesenen Vorkommnisse dieser Säure kennenzulernen, denn von der Citronensäure gilt das gleiche wie von der Äpfelsäure; von ihr wird ebenfalls angenommen, daß sie als ein allgemein verbreiteter Körper im Pflanzenreich nachgewiesen sei. In den einschlägigen Handbüchern finden sich 223 Arbeiten aufgeführt, nach denen Citronensäure in 137 Pflanzen vorkommen soll. Eine Reihe von Arbeiten war uns nicht zugänglich; sie ist weiter unten zusammengestellt.

Die Beurteilung der Pflanzen wurde nach den gleichen Grundsätzen durchgeführt, wie sie auch bei denen über die Äpfelsäure angewandt wurden, d. h. die Citronensäure wurde nur dann als sicher nachgewiesen angesehen, wenn sie in einwandfreier Weise isoliert und die Säure selbst oder ihre Salze der quantitativen Analyse unterworfen wurden. Falls nur qualitative Reaktionen zur Kennzeichnung der Säure angewandt wurden, so wurde dies im allgemeinen nicht als ausreichend angesehen. Den Gang der Untersuchung haben wir bei den

¹⁾ 23. Mitteilung; *H. Franzen* und *E. Keyssner*, siehe diese Zeitschr. 135, 183, 1923.

einzelnen Arbeiten jedesmal kurz geschildert, damit sich jeder selbst ein Urteil bilden kann, ob der Nachweis zureichend ist oder nicht; unsere Ansicht haben wir kurz vermerkt. Legt man die bei der Äpfelsäure auseinandergesetzten Kriterien an die Arbeiten über Citronensäure an, dann bleiben von den in der Literatur aufgeführten Vorkommnissen dieser Säure in 137 Pflanzen nur noch die folgenden übrig:

Citronensäure ist wahrscheinlich nachgewiesen in:

1. Tabak, *Nicotiana Tabacum* (Blätter).
2. Maulbeere, *Morus nigra* (unreife Beere).
3. Affenbrotbaum, *Adansonia digitata* (Frucht).

Citronensäure ist sicher nachgewiesen in:

1. Apfelbaum, *Pirus malus* (Stammrinde).
2. *Richardsonia scabra* (Kraut und Wurzel).
3. Weinrebe, *Vitis vinifera* (Blutungssaft).
4. Sauerkirsche, *Prunus cerasus* (Blätter).
5. Lupinensamen.
6. Zuckerrohr, *Saccharum officinarum* (Saft des Rohres).
7. Moosbeere, *Vaccinium oxycoccos* (Frucht).
8. Krapp, *Rubia tinctorum* (Wurzel).
9. Schöllkraut, *Chelidonium majus* (Kraut).
10. Erbse, *Pisum sativum* (Samen).
11. Wicke, *Vicia sativa* (Samen).
12. Saubohne, *Vicia faba* (Samen).
13. Vogelbeere, *Pirus Aucuparia* (Beeren).
14. Citrone, *Citrus Aurantium* (Frucht).
15. Johannisbeere, *Ribes rubrum* (Beere).
16. Kirsche, *Prunus avium* (Frucht).

Das Ergebnis der kritischen Durchsicht der Literatur ist also im Falle der Citronensäure annähernd ebenso schlecht wie in dem der Äpfelsäure, da von den 137 Pflanzen, in denen diese Säure vorkommen soll, nur 16 übrig bleiben, in denen ihre Anwesenheit sicher ist. Es ist also durchaus nicht sichergestellt, daß die Citronensäure ein allgemein verbreiteter Pflanzenstoff ist.

Arbeiten, in denen das Vorhandensein von Citronensäure in Pflanzen lediglich behauptet wird.

1. *Foucroy* und *Vauquelin* (Ann. de Chim. (1) 65, 166, 1808):
In der Zwiebel, *Allium cepa*.
2. *G. H. Stoltze* (Berlin. Jahrb. f. Pharm. 18, 49, 1817; oder Deutsch. Jahrb. f. Pharm. 3, 48, 1817):
In der Gichtrose, *Rhododendron Chrysanthum*.
3. *K. v. Grundner* (Buchners Repert. f. Pharm. 96 (46), 322, 1847):
Im Spindelbaum, *Evonymus europaeus*.
4. *Michaelis* (Journ. f. prakt. Chem. (1) 54, 184, 1851):
In der Runkelrübe, *Beta vulgaris*.
5. *F. Michaelis* (Dinglers polytechn. Journ. 125, 57, 1852):
In der Zuckerrübe, *Beta vulgaris*.

6. *V. Dessaignes* und *J. Charvard* (Journ. de Pharm. et de Chim. (3) 21, 26, 1852; Journ. f. prakt. Chem. (1) 55, 323, 1852):
In der Judenkirsche, *Physalis Alkekengi*.
7. *Tilloy* (Journ. de Pharm. et de Chim. (3) 23, 409, 1853):
In der Meerzwiebel, *Scilla maritima*.
8. *L. A. Buchner* (Buchners neues Repert. d. Pharm. 2, 1, 1853; oder (3) 2, 1, 1853):
In den Blütenknospen von *Spiraea Ulmaria*.
9. *V. Dessaignes* (Journ. de Pharm. (3) 25, 24, 1854):
In der indischen Rose, *Tagetes erectus*.
10. *F. Daubrawa* (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 3, 337, 1854):
Im Hirtentäschelkraut, *Capsella bursa pastoris*.
11. *Deschamps* (Ann. de Chim. et de Phys. (4) 1, 457, 1864):
In den Samenkapseln des Schlafmohns, *Papaver somniferum*.
12. *F. Rochleder* (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 3, 238, 1870):
In der Rinde und in den Blättern des Weichselbaumes, *Cerasus acida*.
13. *Wright* und *Patterson* (The Chemical News 37, 6, 1878):
In den unreifen Maulbeeren, *Morus nigra*.
14. *A. Klinger* und *A. Bujard* (Repert. d. analyt. Chem. 7, 412, 1887):
In den Blüten von *Bassia oleracea*.
15. *E. Heckel* und *A. Schlagdenhaufen* (Journ. de Pharm. et de Chim. (5) 19, 14, 1889):
In den Blüten von *Dalium nitidum*.
16. *W. A. H. Naylor* und *E. M. Chaplin* (The Pharm. Journ. and Trans. (3) 20, 273, 1889/90):
In *Eunonymus atropurpureus*.
17. *C. Mestre* (Journ. de Pharm. et de Chim. (5) 24, 292, 1891):
Im Orangensaft und -wein, *Citrus aurantium*.
18. *E. Mach* und *K. Portele* (Landw. Vers.-Stat. 38, 72, 1891):
In den Preiselbeeren, *Vaccinium Vitis Idaea*.
19. *G. Dragendorff* (Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten, S. 397. Stuttgart 1898):
Im Gerbersumach, *Rhus coriaria*.
20. *R. Kayser* (Zeitschr. f. öffentl. Chem. 12, 155, 191, 1906):
In den Himbeeren, *Rubus idaeus*.
21. *T. Takahaschi* (The Bull. of the Coll. of Agric., Tokyo 7, 11, 1906):
In den Früchten der japanischen Mispel, *Eriobotrya japonica*.
22. *Barrowcliff* und *Frank Tutin* (Proc. of the Chem. Soc. 23, 249, 1908):
In der Wurzel von *Morinda longiflora*.
23. *K. Windisch* und *Ph. Schmidt* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 17, 502, 1909):
In verschiedenen Früchten.
24. *Th. Peckolt* (Ber. d. deutsch. pharm. Ges. 19, 351, 1909):
In *Passiflora alata*.
25. *R. H. Lott* (The Chemical News 99, 169, 1909):
In den Früchten von *Viburnum nudum*.
26. *I. M. Gilchrist* (The Chemical News 99, 211, 1909):
In *Aralia hispida*.
27. *B. Reed* (The Chemical News 99, 303, 1909):
In *Pyrus arbutifolia*.

28. *L. Gouldin* (The Chemical News 100, 130, 1909):
In den Früchten von *Rosa centifolia*.
29. *R. E. Neidig* (The Chemical News 102, 40, 1910):
In der Frucht von *Menispermum canadense*.
30. *G. Scheets* (The Chemical News 108, 172, 1911):
In *Cornus Paniculatum*.
31. *E. Dawson* (The Chemical News 106, 18, 1912):
In *Diervilla florida*.
32. *C. B. Smith* (The Chemical News 107, 266, 1913):
In den Schneebeeren, *Symphoricarpus racemosus*.
33. *B. Armstrong* (The Chemical News 107, 280, 1913):
In *Crataegus Macracantha*.
34. *H. D. Gibbs* und *F. Agcaoili* (The Philipp. Journ. of Scienc. 7, A., 403, 1912):
In *Citrus nobilis*, *Citrus lima* und *Citrus milis*.
35. *D. S. Pratt* und *J. J. de Rosario* (The Philipp. Journ. of Scienc., Manila, 8, A., 59, 1913):
In *Mangifera indica*, *Ananas sativa*, *Citrus decumana*, *Carica papaya*, *Carica hermaphrodite*, *Cucumis melo*, *Cucumis espanol*, *Citrullus vulgaris*, *Eugenia javanica*, *Carcinia mangostana*, *Psidium guajava*, *Sandoricum koetjape*, *Lansium domesticum*, *Durio zibethinus* und *Antidesma bunius*.
36. *A. Klütschareff* (Journ. f. landw. Versuchsw., Berlin, 61, 174, 1913):
Im Tabak, *Nicotiana Tabacum*.
37. *J. du P. Cost Huizen* und *O. M. Scheed* (Journ. of the Amer. Chem. Soc. 35, 1308, 1913):
Im Tabak, *Nicotiana Tabacum*.
38. *P. Q. Keegan* (The Chemical News 113, 86, 1916):
In der Vogelwicke, *Vicia cracca*.
39. *Bracconot* (Ann. de Chim. (2) 6, 122, 1817):
In *Clematis flammula*, *Küchenschelle*, *Anemone pulsatilla*, *Buschwindröschen*, *Anemone nemorosa*, *Actaea spirata*.
40. *Bérard* (Ann. de Chim. et de Phys. 16, 225, 1821):
In den Johannisbeeren, *Ribes rubrum*.
41. *O. Silvestri* (Journ. de Chim. médical, de Pharm. et de Toxicologie, Paris, (5) 6, 382, 1870):
In den Früchten des Tomatobaumes, *Cyphomandra batacca*.
42. *Husemann* und *Hilger* (Die Pflanzenstoffe, S. 811):
In *Drosera intermedia*.
43. *G. F. Walz* (Jahrb. f. prakt. Pharm. 26 (oder neue Folge 23), 297, 1853; 27 (oder neue Folge 30), 12, 65, 129, 1853):
Im Braunwurz, *Scrophularia nodosa*, Antonskraut, *Scrophularia aquatica*, Leinkraut, *Linaria vulgaris*.
44. *E. Stockton* und *C. G. Eldredge* (The Chemical News 98, 191, 1909):
Im blauen Hahnenfuß, *Caulophyllum thalictroides*; in *Cornus sericea*.
45. *R. Schwarz* (Ann. d. Chem. 84, 361, 1852; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 9, 298, 1852):
In den Blättern der Alpenrose, *Rhododendron Ferrugineum*.
46. *Rochleder* (Ann. d. Chem. 84, 354, 1852; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 9, 286, 1852):
In der gemeinen Heide, *Calluna vulgaris*.

47. *A. Kavalier* (Journ. f. prakt. Chem. (1) **64**, 16, 1855; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. **13**, 514, 1854):
Im abendländischen Lebensbaum, *Thuja occidentalis*.
48. *Rochleder* (Journ. f. prakt. Chem. (2) **1**, 437, 1870; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. **61**, 1870):
In den Früchten der Weichselkirsche, *Cerasus acida*.
49. *H. Biltz* (Magaz. f. Pharm. von *Geiger* **8**, 293, 1824):
In den Hagebutten, *Rosa canina*.
50. *F. Öhren* (Zeitschr. f. Chem. **10**, 28, 1867):
In *Galium Mollugo*.
51. *J. Lefort* (C. r. **42**, 91, 1856):
Im *Boletus pseudo-ignarius*.
52. *Peckolt* (The Pharm. Journ. and Trans. **10**, 343, 1879/80):
In der Melone, *Carica papaya*.
53. *P. Carles* (Botan. Jahresber. von *Just* **6**, 251, 1878):
In der Citrone, *Citrus limonum*.
54. *E. Both* (Botan. Jahresber. von *Just* **18**, 429, 1890):
In der Tomate, *Solanum lycopersicum*.
55. *Prescott* (Botan. Jahresber. von *Just* **6**, 251, 1878; Amer. Journ. of Pharm. **50**, 566):
56. *Proust* (Allgem. Journ. d. Chem. von *Scherer* **8**, 626, 1802):
In den Johannisbeeren, *Ribes rubrum*.
57. *Riegel* (Arch. d. Pharm. (2) **61**, 3, 1850; Pharm. Zentralbl. 1850, S. 319):
In der Myrte, *Myrtus communis*.
58. *Chevreul* (Lecons de Chimie appliqué à la Teinture **2**, 143, 1833; Pharm. Zentralbl. 1833, S. 191):
Im Wau, *Reseda luteola*.
59. *Brandl* und *Rakowiech* (Bull. de la Soc. chim. de Paris (2) **3**, 471, 1865):
In den Bucheckern, *Fagus sylvatica*.
60. *Chautard* und *Dessaignes* (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **1**, 593, 1852; Journ. de Pharm. **21**, 24, 1852):
In der Judenkirsche, *Physalis alkekengi*.
61. *Wrigth* und *Patterson* (Journ. of the Chem. Soc. of London **12**, 20, 1877):
In den Maulbeeren, *Morus nigra*.

Arbeiten, in denen die Fruchtsäuren titriert und als Citronensäure in Rechnung gezogen werden.

1. *E. Reich* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **22**, 208, 1912):
Reife und unreife Bananen, *Musa sapientum*.
2. *H. Krämer* (Amer. Journ. of Pharm. **85**, 398, 1913):
In den Früchten von *Rhus glabra*.
3. Tätigkeitsbericht des chemischen Versuchs- und Hefereinzuchts-laboratorium der k. k. höheren Lehranstalt für Wein- und Obstbau in Klosterneuburg:
In den Himbeeren, Johannisbeeren, Stachelbeeren, Mirabellen und Pflaumen.
4. *A. Behre* und *K. Frerichs* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. **22**, 733, 1912):
Im Ananas, *Ananas sativus*.

5. *Hepner* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 25, 204, 1913):
In den Himbeeren, *Rubus idaeus*.
6. *Krzsian* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 11, 205, 1906):
In den Himbeeren, *Rubus idaeus*.
7. *Zoller* (Journ. of Ind. and Eng. Chem. 10, 364, 1918):
In *Citrus decumana*.
8. *Chauvin* (Moniteur scientifique (4) 22, 449, 1908):
In verschiedenen Früchten.
9. *Warnington* (Buchners Repert. d. Pharm. (3) 25, 69, 1876):
In der Limone.
10. *Hempel* (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 12, 725, 1906):
In den Himbeeren, *Rubus idaeus*.
11. *Duggar* (Ann. of the Missouri Botanical Garden 1, 237, 1914):
In den Tomaten, *Solanum Lycopersicum*.

Arbeiten, in denen versucht wurde, die aus Pflanzen abgeschiedene Säure als Citronensäure durch qualitative Reaktionen zu kennzeichnen.

C. W. Scheele (Crells chem. Ann. 2, 291, 1785) hat in einer ganzen Reihe von Früchten Citronensäure aufgefunden; die von diesem Forscher angewandte Methode des Nachweises der fraglichen Säure ist jedoch, wie aus der Arbeit von *Hartwig Franzen* und *Ernst Keyssner* über das Vorkommen der Äpfelsäure in den Pflanzen hervorgeht, nicht zureichend, um die Anwesenheit der Säure in den erwähnten Früchten sicherzustellen. Viel Citronensäure und fast gar keine Äpfelsäure wurde in den folgenden Früchten gefunden: Moosbeeren, *Vaccinium oxycoccus*, Preiselbeeren, *Vaccinium vitis idaea*, Traubenkirschen, *Prunus padus*, Bittersüß, *Solanum dulcamare*, Hagebutten, *Rosa canina*. Zu ungefähr gleichen Teilen Citronensäure und Äpfelsäure sind nach *Scheele* enthalten in den: Stachelbeeren, *Ribes grossularia*, Johannisbeeren, *Ribes rubrum*, Heidelbeeren, *Vaccinium myrtillus*, Mehlbeeren, *Crataegus avia*, Erdbeeren, *Fragaria vesca*, blasse Brombeere, *Rubus chamaemorus*, Himbeere, *Rubus idaeus*. Wenig oder gar keine Citronensäure enthalten: Berberitzen, *Berberis vulgaris*, Holunderbeeren, *Sambucus nigra*, Schlehen, *Prunus spinosa*, Vogelbeeren, *Pirus aucuparia*, Pflaumen, *Prunus armeniaca*. Nach *Scheele* ist die Säure der unreifen Weintrauben, *Vitis vinefera*, und der Tamarinden, *Tamarindus indica*, ganz und gar Citronensäure. Diese letztere Angabe ist ein weiterer Beweis dafür, daß die Methode *Scheeles* unzureichend ist, um die Citronensäure mit voller Sicherheit nachzuweisen, da die Säure dieser Früchte ganz überwiegend aus Weinsäure besteht. Ferner spricht für die Unzuverlässigkeit der Methode *Scheeles* die Angabe, daß die Säuren der Johannisbeeren zu ungefähr gleichen Teilen aus Citronensäure und Äpfelsäure bestehen, während *Hartwig Franzen* und *Eugen Schuhmacher* nachweisen konnten, daß die Citronensäure bei weitem überwiegt.

Der von Scheele geführte Nachweis der Citronensäure in den weiter oben aufgeführten Früchten ist unzureichend.

Vauquelin [Ann. de Chim. (1) 5, 98, 1790] stellte aus Tamarinden, *Tamarindus indica*, einen wässerigen Auszug her, fällte mit Pottasche die Weinsäure aus und kochte dann mit Kreide, wobei sich unter Aufbrausen ein Niederschlag bildete. Dieser wurde mit Schwefelsäure zersetzt und das Filtrat vom Gips eingedunstet, wobei „die auf ein kleines Volumen reduzierte Flüssigkeit sich in eine Masse weißer unregelmäßiger Kristalle verwandelte, die sich in Wasser leicht auflösten und deren Auflösung weder

durch Oxalsäure, noch durch salzsauren Baryt oder Pottasche gefällt wurde, aber die einen Niederschlag mit Kalkwasser bildete“. Aus diesen Reaktionen wird geschlossen, daß Citronensäure vorliegt.

Der Nachweis ist unzureichend.

P. A. Adet (Crells Ann. 2, 191, 1800; Ann. de Chim. 25, 32, 1798; Allgem. Journ. d. Chem. von Scherer 1, 663, 1798) dampfte Ananassaft, *Ananas sativus*, auf drei Viertel seines Volumens ein, fällte Zucker und Schleimstoffe durch Alkohol, dampfte das Filtrat ein, nahm den Rückstand mit zwei Teilen Wasser auf, fällte mit Calciumcarbonat und filtrierte den reichlichen Niederschlag ab. Aus dem Filtrat schied sich am Boden des Gefäßes eine dünne weiße Kruste ab, auf der sich kleine undurchsichtige weiße, unregelmäßig gruppierte Flitter befanden. Nach dem Abfiltrieren wurde die Kristallisation mit Wasser ausgekocht, wobei sich die kleinen Kriställchen lösten. „Der Niederschlag, welchen ich vermittelt des kohlensauren Kalkes bekommen, und die Kristallisation, die ich zugleich erhalten hatte, gibt mir hinlänglichen Aufschluß über die Natur dieser Säure. Der Niederschlag kündigt mir die Gegenwart der Citronensäure, die Kristallisation die Gegenwart der Äpfelsäure in dem Saft der Ananas an.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Henry Braconnot [Ann. de Chim. (1) 74, 276, 1810] fällte den Saft grüner Walnußschalen, *Juglans regia*, mit Bleiacetat, zerlegte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und dampfte das Filtrat vom Bleisulfid ein; dann wurde Calciumcarbonat hinzugefügt, erhitzt und filtriert; beim Eindampfen wurde eine körnige, gefärbte Masse erhalten und aus dieser durch Behandeln mit kaltem Wasser der äpfelsaure Kalk herausgelöst; der unlösliche Teil wurde mit Schwefelsäure zersetzt und dabei eine noch durch Äpfelsäure verunreinigte Citronensäure erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

Vogel (Schweigers Journ. f. Chem. u. Phys. 6, 101, 1812) dampfte den filtrierten farblosen Saft der Meerzwiebel, *Scilla maritima*, auf die Hälfte ein; beim Erkalten setzte sich ein aus feinen, glänzenden Nadeln bestehender Niederschlag ab. „Durch weitere Versuche, welche ich weiter unten anführen werde, habe ich mich überzeugt, daß dieser Niederschlag aus zitronensaurem Kalk besteht.“ „Eine allgemeine Tatsache ist, daß Meerzwiebelwein und Meerzwiebeleessig nach einiger Zeit einen Niederschlag absetzen.“ Dieser Niederschlag wurde getrocknet, zur Entfernung von Gerbstoff mit Alkohol extrahiert, dann mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt, das Filtrat vom Calciumsulfat konzentriert und ein Teil in konzentrierte Kalilauge eingetragen, wobei kein Niederschlag entstand. Hieraus wird auf die Abwesenheit von Weinsäure geschlossen. Kalkwasser bildete mit der konzentrierten Lösung einen Niederschlag, der sich sowohl in Weinsäure als auch in Citronensäure wieder auflöste. „Es erhellt hieraus, daß dieser Niederschlag kein kleesaurer Kalk sein konnte, welcher, wie bekannt, sich nicht in Citronensäure oder Weinsäure auflöst.“ „Ich muß hieraus schließen, daß die Bodensätze im Meerzwiebelwein und Meerzwiebeleessig aus zitronensaurem Kalk und Gerbstoff bestehen.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Henry Braconnot [Ann. de Chim. et de Phys. (2) 6, 122, 1817] kochte 10 g der Fruchthüllen des Nelkenpfeffers, *Pimenta officinalis*, mit Alkohol aus; der beim Erkalten sich absetzende Niederschlag wurde mehrmals mit kochendem Wasser behandelt und die wässerigen Auszüge zur Trockne

eingedampft. Aus dem Rückstand wurden durch Alkohol gummiartige Massen entfernt, dann mit Bleiacetat gefällt und aus dem Bleiniederschlag die freie Säure gewonnen. Mit dieser wurden eine Reihe qualitativer Reaktionen angestellt, die aber absolut nicht sicher beweisen, daß Citronensäure vorliegt.

Der Nachweis ist unzureichend.

Vogel (Schweigers Journ. f. Chem. u. Phys. 20, 413, 1818) preßte Heidelbeeren, *Vaccinium myrtillus*, aus und filtrierte den Saft. „Er enthält weder freie noch gebundene Weinsäure und bildet mit Kalkwasser keinen Niederschlag, welcher weinsteinsaurer Kalk sein könnte.“ Erst beim Kochen entsteht ein Niederschlag von weißen Kristallen. „Es bildeten sich aber beim Abbrauchen weiße erdige Kristalle von zitronensaurem Kalk. Die über diesen Kristallen schwimmende Flüssigkeit wurde mit essigsaurem Blei versetzt, worauf ein gelblich weißer Niederschlag erfolgte, welcher in äpfelsaurem Blei bestand.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Payen (Journ. de Pharm. 9, 386, 1823; Jahrb. d. Chem. u. Phys. 9, 338, 1823; Schweigers Journ. 39, 338, 1823) erschöpfte Georginenknollen, *Dahlia variabilis*, zunächst mit Alkohol und zog dann mit Wasser unter Zusatz von etwas Ammoniak aus. Der wässrige Auszug wurde mit einem Überschuß von Calciumcarbonat gekocht und dann filtriert. „Der Niederschlag enthielt zitronensauren und äpfelsauren Kalk; man trennte sie und erhielt aus ihnen die Äpfel- und Citronensäure nach dem Verfahren *Vauquelin's*.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Henry Braconnot [Ann. de Chim. et de Phys. (2) 25, 368, 1824] fällte den Saft von Topinamburknollen, *Helianthus tuberosus*, mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und engte das Filtrat vom Bleisulfid ein. Aus dem nicht kristallisierenden Rückstand schied Alkohol eine körnige weiße Masse ab, die zum Teil aus Calciumcitrat bestand. „Die alkoholische Lösung der Säure trübte sich durch Erhitzen und wurde durch Abkühlen wieder klar. Die Säure wurde mit Calciumcarbonat gesättigt, die Lösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit etwas Wasser gewaschen. Es blieb ein weißes, wenig lösliches Kalksalz zurück, welches mit Schwefelsäure zerlegt wurde; aus dem Filtrat vom Gips wurde eine Säure erhalten, die alle Eigenschaften der Citronensäure zeigte.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Tilloy (Journ. de Pharm. 13, 306, 1827; Berzelius Jahresber. 7, 244, 1828) zerquetschte, um Citronensäure zu gewinnen, 100 Pfund Johannisbeeren, *Ribes rubrum*, bzw. Stachelbeeren, *Ribes Grossularia*, ließ zunächst den Zucker vergären, preßte das Ganze aus und sättigte mit kohlensaurem Kalk. „Der zitronensaure Kalk wird ausgewaschen und auf die gewöhnliche Weise durch verdünnte Schwefelsäure zersetzt“; die erhaltene Säure wird durch nochmaliges Füllen, Zerlegen des Kalksalzes und durch Kochen mit Tierkohle gereinigt und dann die Lösung zur Kristallisation eingedampft. Die Säure wird so nicht ganz farblos erhalten, kann aber durch wiederholte Kristallisation gereinigt werden. Da weder Analysen noch qualitative Reaktionen angegeben sind, dürfte es nicht sicher sein, ob *Tilloy* tatsächlich reine Citronensäure in Händen gehabt hat.

Der Nachweis ist unzureichend.

Lebreton (Journ. de Pharm. 14, 383, 1828) zog Pomeranzen, *Citrus Bigaradia*, mit Alkohol aus, dampfte den Auszug ein, behandelte den Rückstand mit Äther, löste in Wasser und fällte mit Bleiacetat. Das Filtrat vom zersetzten Bleiniederschlag wurde bei 20 bis 25° verdunstet; bei längerem Stehen schieden sich Kristalle ab, die durch Umkristallisieren gereinigt wurden. „Die Lösung rötete Lackmus, gab mit Kalkwasser ein unlösliches Salz, aber zerlegte keine Kalksalze; bei teilweiser Neutralisation mit Ätzkali entstand kein Niederschlag; alle die Merkmale lassen auf Citronensäure schließen.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Justus Liebig (Ann. de Pharm. 5, 141, 1833) versetzte den Saft der Vogelbeeren, *Pirus aucuparia*, mit kohlensaurem Kalk bis zur beinahe neutralen Reaktion, fällt mit Bleinitrat und kocht den Bleiniederschlag so lange mit verdünnter Schwefelsäure, bis er seine körnige Beschaffenheit verloren hat. Zu der breiartigen Masse wird Schwefelbarium so lange zugesetzt, bis Barium im Überschuß vorhanden ist, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelbarium und zuletzt mit Bariumcarbonat vollständig gesättigt und erhitzt. Beim Neutralisieren bildet sich stets ein großer körniger Niederschlag von weinsaurem und zitronensaurem Baryt, von welchem abfiltriert wird.

Der Nachweis ist unzureichend.

L. F. Bley [Journ. f. prakt. Chem. (1) 6, 294, 310, 1835] fällte den wässerigen Auszug der Aprikosen, *Prunus armeniaca*, mit Bleiacetatlösung, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, engte das Filtrat vom Bleisulfid ein und entfernte durch Behandeln mit Alkohol Gummistoffe. Die alkoholische Lösung lieferte beim Eindunsten eine gelbbraune, sirupartige Flüssigkeit, die bei längerem Stehen an warmer Luft kristallinische Ansätze zeigte. *Bley* hält die Kristalle für unreine Citronensäure, gemischt mit Spuren Äpfelsäure. Über die Trennung der beiden Säuren ist nichts angegeben. Die Äpfelsäure wird durch die Reaktion mit schwefelsaurem Kupferoxydammoniak, wobei ein apfelgrüner Niederschlag entsteht, gekennzeichnet. Die Citronensäure wird in folgender Weise nachgewiesen: „In Wasser zeigte sich diese Säure leicht löslich, schwieriger in Alkohol. Die Lösung in Wasser verhielt sich gegen Reagenzien also: Lackmus stark gerötet; Bleizucker starken weißen Niederschlag; Kalkwasser Niederschlag, in Salpetersäure löslich; Kalilösung gab nach der Sättigung eine braune hygroskopische Salzmasse; kohlensaures Natron gab ein braunes Salz, welches ebenfalls ein wenig Feuchtigkeit zeigte.“

Der Nachweis ist unzureichend.

L. F. Bley [Arch. d. Pharm. d. Apothekerver. im nördlichen Teutschland, ganze Reihe 63 (zweite Reihe 13), 251, 1838] dickte den Saft völlig reifer Himbeeren, *Rubus idaeus*, ein, entfärbte mit Tierkohle und sättigte mit Kreide. Aus dem Niederschlag wurde durch Behandeln mit heißem Wasser äpfelsaurer Kalk herausgelöst und das unlösliche Kalksalz mit Schwefelsäure zersetzt. Das Filtrat vom Gips schied nach dem Eindampfen „schwach gelblich gefärbte Kristalle von sehr saurem Geschmack, die in freier Flamme schmolzen, aufblähten, unter anfangs zuckerähnlichem, hernach stechendem Geruch verkohlten. In Wasser lösten sich die Kristalle leicht. Die Auflösung gab, mit kohlensaurer Kalkerde versetzt, ein kristallinisches Salz.“ „Salzsaure Kalklösung gab weder Trübung noch Kristallsalz. Essigsaures Blei bewirkte einen Niederschlag, salpetersaures nicht.

Goldlösung ward schnell reduziert. Die Säure ist für Citronensäure zu halten. Das Mengenverhältnis zu Äpfelsäure wie 8 : 13.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Fr. Michaels [Arch. d. Pharm. d. Apothekerver. im nördlichen Teutschland (2) 18, 236, 1838] preßte Kartoffeln, *Solanum tuberosum*, aus, verdunstete den Saft, nahm den Rückstand mit Wasser auf, filtrierte und fällte das Filtrat mit Bleiacetatlösung. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid eingedampft und durch Behandeln mit Alkohol Gummistoffe entfernt. „In der davon getrennten Flüssigkeit zeigte sich mir Citronensäure, aber keine Spur Weinsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Walz [Jahrb. f. prakt. Pharm. 7 (oder neue Folge 4), 285, 1843; 8 (oder neue Folge 5), 149, 1844] extrahierte die gröblich gepulverte Wurzel von *Escholtzia californica* mit durch Essigsäure angesäuertem Wasser, fällte dann mit Ammoniak und weiterhin mit Bleiacetatlösung. Aus dem Bleiniederschlag wurden Barytsalze hergestellt und diese mit Weingeist ausgezogen. Der in Weingeist unlösliche Anteil von den Barytsalzen wurde mit heißem Wasser ausgezogen; es fand sich in der Lösung: Salzsäure, Citronensäure, Äpfelsäure ...“

Der Nachweis ist unzureichend.

Walz [Jahrb. f. prakt. Pharm. 5 (oder neue Folge 2), 284, 1842] behandelte den eingedickten wässerigen Auszug der Wurzeln der Einbeere, *Paris quadrifolia*, mit Alkohol in der Wärme, filtrierte vom Unlöslichen ab, verdampfte den Alkohol und nahm den Rückstand mit Wasser auf. „Es entstand durch Bleizucker ein bleibender Niederschlag; nach der Zersetzung mit Hydrothionsäure enthielt er Citronensäure, Äpfelsäure usw.“

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Riegel [Arch. d. Pharm., zweite Reihe 55 (ganze Reihe 105), 151, 1848] fällte den Saft reifer Beeren von *Vitis sylvestris* mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und versetzte das Filtrat vom Bleisulfid mit Ätzbaryt. Der Barytniederschlag bestand „aus weinsauerm, äpfelsauerm und einer geringen Menge zitronensaurem Baryt. Die von diesen Salzen abfiltrierte Flüssigkeit wurde zur Trockne verdunstet und mit Äther digeriert, der nur Spuren von Chlorophyll daraus aufnahm; Alkohol entzog ihm eine geringe Menge Farbstoff. Der in Äther und Alkohol unlösliche Teil der Salzmasse bestand aus weinsauerm, äpfelsauerm und zitronensaurem Baryt.“

S. 154. „Die Ähnlichkeit der reifen Beeren der *Vitis sylvestris* mit den reifen Beeren von *Sambucus ebulus* und *nigra* und *Vaccinium myrtillus* veranlaßte noch eine vergleichende Untersuchung... die übrigen Bestandteile der Beeren von *Sambucus ebulus* und *nigra* sind... hauptsächlich Äpfelsäure mit Spuren Citronensäure.... Die Heidelbeeren enthalten Äpfel- und Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Riegel [Arch. d. Pharm., zweite Reihe 61 (der ganzen Reihe 111), 161, 1850] zerstiess 2 Pfund reife Beeren der Myrte, *Myrtus communis*, und unterwarf sie der Wasserdampfdestillation, bis keine Öltröpfchen mehr übergingen. „Der Rückstand von der Destillation wurde filtriert, im Wasserbade verdampft, hierauf mit Alkohol bei gelinder Wärme bis zur völligen Erschöpfung behandelt. Nach Entfernung des größten Teiles des Alkohols durch Destillation wurde der Rückstand im Wasserbade

verdampft und das zurückgebliebene Extrakt a) mit Äther ausgezogen (ölharziger Rückstand), b) mit Alkohol ausgezogen (Zucker, Extraktivstoffe), c) der in Äther und Alkohol unlösliche Rückstand des ursprünglichen wässerigen Extrakts ward in Wasser gelöst.“ Der mit Schwefelwasserstoff zerlegte Bleiniederschlag wurde „mit Ammoniak neutralisiert, dann mit einer Auflösung von Chlorbarium und salpetersaurem Silber versetzt, wodurch in beiden Fällen ein weißer, in Salpetersäure löslicher Niederschlag entstand. Chlorcalcium bewirkte bei gewöhnlicher Temperatur keinen Niederschlag, wohl aber beim Kochen einen weißen, in Kali unlöslichen, in Ammoniaksalzen und freier Säure löslichen Niederschlag: Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

H. Bracconot [Journ. f. prakt. Chem. (1) 89, 134, 1850] extrahierte 100 g Eicheln, *Quercus pedunculata*, *Quercus sessiliflora*, mit Wasser, filtrierte und dampfte das Filtrat bis zur Honigkonsistenz ein. Nach einem Jahre hatten sich „harte sandähnliche Körner und ein fein zerteiltes erdiges Salz“ abgeschieden. Die Abscheidung wurde mit Alkohol gewaschen und dann mit siedendem Wasser behandelt, wobei das erdige Salz ungelöst zurückblieb, welches abfiltriert wurde. 0,1 g. Bei der Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure entstand schwefelsaurer Kalk; das Filtrat von diesem kristallisierte nach dem Eindampfen mit großer Schwierigkeit. „Die wässrige Lösung wurde durch salpetersaures Bleioxyd nicht getrübt. Mit essigsaurem Bleioxyd entstand ein reichlicher weißer Niederschlag, der sich nicht in Essigsäure, wohl aber in verdünnter Salpetersäure auflöste. In kleiner Menge in Barytwasser gegossen, entstand ein weißer voluminöser Niederschlag, der durch Salpetersäure wieder verschwand. Kalkwasser wird im Augenblick des Zusammengießens nicht getrübt, erst nach 2 Stunden hat sich ein geringer Niederschlag gebildet. Nach den angegebenen Eigenschaften scheint die fragliche Säure Citronensäure zu sein.“

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Willigk [Ber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 9, 302, 1852; Journ. f. prakt. Chem. (1) 58, 205, 1852; Ann. d. Chem. 84, 363, 1852] untersuchte die Blätter des Sumpfporstes, *Ledum palustre*. „Das braunrote Dekokt gibt auf Zusatz von Bleizucker einen in Essigsäure beinahe unlöslichen Niederschlag von schmutzig-brauner Farbe, später entsteht ein gelber, in verdünnter Essigsäure leicht löslicher Niederschlag.“ Gerbsäure. Der erste Niederschlag wurde entbleit, das Filtrat mit Tierkohle behandelt und die gereinigte Lösung verdunstet. „Aus der konzentrierten Lösung kristallisierte nach mehrere Monate langem Stehen die Citronensäure in großen regelmäßigen Kristallen aus.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Justus Wolff (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 3, 1, 1854) zerlegte den aus dem wässerigen Auszug des Birkenschwamms, *Boletus scaba*, erhaltenen Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, dampfte das Filtrat vom Schwefelblei zur Sirupdicke ein und nahm den Rückstand mit Wasser auf. „Die Lösung gab mit Kalkwasser einen in Salmiak löslichen Niederschlag; das Filtrat trübte sich beim Erhitzen. Mit Bariumchlorid entstand in dieser Lösung kein Niederschlag; ebenso keiner beim Erwärmen mit molybdänsaurem Ammon und Salpetersäure.“ „Demnach bestanden die von Riegel (Jahrb. f. prakt. Pharm. 12, 168) gefundene Schwammsäure und Boletsäure aus Weinsäure, Citronensäure und Äpfelsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

H. Hlasiwetz [Journ. f. prakt. Chem. (1) **65**, 445, 1855; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. **15**, 165, 1855] fällte die Abkochung der Wurzel des Hauhechels, *Ononis spinosa*, mit Bleizucker, zerlegte mit Schwefelwasserstoff und dampfte das Filtrat vom Bleisulfid langsam zur Sirupdicke ein. Nach langem Stehen setzten sich kleine geschmacklose Kristalle ab; sie wurden abfiltriert, mit Wasser gewaschen, in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure zersetzt; das Filtrat vom Gips gab nach wochenlangem Stehen harte, stark saure Kristalle, die alle Eigenschaften der Citronensäure besaßen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Vielguth (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **5**, 193, 1856) trocknete ganze Pflanzen von *Galium mollugo*, jedoch ohne Wurzel und extrahierte die gröblich gepulverten Pflanzen zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und kochte schließlich mit Wasser aus. Der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid „mit Kalkwasser versetzt und gekocht; es entstand kaum eine leise Trübung, Spuren von Citronensäure anzeigend“. Das Filtrat vom Bleiniederschlag gab mit Ammoniak einen zitronengelben Niederschlag, der abfiltriert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. „Ein Teil dieses Filtrats schüttelte man mit Kalkwasser. In der Kälte entstand dadurch keine Trübung, wohl aber, als die Mischung erhitzt wurde. Es war folglich Citronensäure vorhanden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

J. Lefort [Journ. de Pharm. et de Chim. (3) **29**, 198, 1856] entfärbte den geklärten Saft von *Agaricus campestris* mit Tierkohle, dampfte bis zur Kristallisation ein und filtrierte das Gemisch von Mannit und Fumarsäure ab. Die Mutterlauge wurde mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid eingedampft, um die letzten Anteile Fumarsäure zu entfernen. Das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert, mit Calciumchloridlösung versetzt und dadurch Calciumsulfat und Calciumphosphat ausgefällt. Das Filtrat hiervon trübte sich beim Erhitzen unter Bildung von unlöslichem Calciumcitrat.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. Lefort [Journ. de Pharm. et de Chim. (3) **31**, 445, 1857] engte den wässrigen Auszug von 1 kg vollkommen trockener Trüffeln auf etwa 250 ccm ein, fällte mit schwach basischem Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und engte das Filtrat vom Bleisulfid bis zur Sirupdicke ein; Fumarsäure schied sich nicht aus. Die Flüssigkeit wurde mit Ammoniak neutralisiert und durch Calciumchloridlösung Phosphorsäure und Schwefelsäure ausgefällt. Das Filtrat von der Fällung gab beim Kochen eine Trübung von Calciumcitrat; in dem Filtrat hiervon konnte Äpfelsäure nachgewiesen werden.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. B. Enz (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **7**, 182, 1858) extrahierte das Blattpulver des Ehrenpreis, *Veronica officinalis*, zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und schließlich mit heißem Wasser. Die wässrige Lösung gab mit Eisenchlorid eine grünliche Färbung, mit Jodlösung und Gipslösung keine Veränderung, während Alkohol einen flockigen Niederschlag erzeugte. „Außerdem bestätigten die Vorreaktionen das spurenweise Vorhandensein folgender Säuren: Citronensäure, Äpfelsäure, Weinsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Michaelis [Journ. f. prakt. Chem. (1) 46, 467, 1859] fällt Rübensaft. *Beta vulgaris*, zur Entfernung von Pektinstoffen mit Alkohol und macht mit Ammoniak alkalisch. Mit essigsaurem Magnesium wurde zunächst die Phosphorsäure und dann mit essigsaurem Kalk die Oxalsäure abgeschieden; das ammoniakalische Filtrat wurde eingedampft, bis es neutral reagierte, dann mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Bleizucker gefällt. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid eingengt und mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb „rein weiße, kristallisierte Citronensäure zurück“.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. Leube jun. (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 9, 321, 1860) extrahierte 50 g fein gepulverte Kamala, *Rottlera tinctoria*, zunächst mit Äther und kochte dann mit Wasser aus. Der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid . . . „mit Kalkwasser gab er kalt keinen, beim Kochen aber einen flockigen Niederschlag, der sich in der Kälte wieder löste“. Im Filtrat vom Bleiniederschlag erzeugte Ammoniak einen Niederschlag; dieser mit Schwefelwasserstoff zerlegte Niederschlag „gab aber ebenfalls mit Kalkwasser erst beim Kochen einen und beim Abkühlen wieder verschwindenden Niederschlag“. „Diese Reaktionen lassen auf Anwesenheit von Citronensäure und . . . schließen.“

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Lindau (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 10, 406, 1861) unterwarf 1,5 Pfund Rinde von *Cedrela Febrifuga* der Wasserdampfdestillation, filtrierte den Destillationsrückstand und fällte die wässrige Lösung mit Bleiacetat. Das Filtrat vom Bleiniederschlag gab, mit Ammoniak neutralisiert, einen Niederschlag, der mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Schwefelblei wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und von abgeschiedenen erdfarbenen Massen abfiltriert. In dem sauren Filtrat wurde durch Kalkwasser ein Niederschlag hervorgerufen, der abfiltriert wurde. „Brachte man das Filtrat zum Kochen, wodurch abermals eine starke Trübung entstand, die indessen beim Erkalten vollständig verschwand (Citronensäure).“

Der Nachweis ist unzureichend.

Fr. Schnitzer (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 11, 1, 1862) extrahierte Lopezwurzeln mit Wasser, zerlegte den Bleiacetatniederschlag mit Schwefelwasserstoff und filtrierte vom Bleisulfid ab. In dem Filtrat erzeugte Chlorbarium eine schwache Trübung. „Kalkwasser bewirkte darin einen flockigen Niederschlag, von dem man schnell abfiltrierte. In dem Filtrat wurde durch Erwärmen aufs neue ein flockiger Niederschlag erzeugt, der beim Erkalten wieder verschwand, mithin die Gegenwart von Citronensäure andeutete.“ Das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde mit Ammoniak gefällt und der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem eingengten Filtrat vom Schwefelblei schied sich nichts aus. „Eisenchlorid und Kalkwasser zeigten auch hier die Gegenwart von Gerbstoff und Citronensäure an.“

Der Nachweis ist unzureichend.

J. Hanamann (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 12, 517, 1863) extrahierte den gröblich gepulverten Samen von *Phalaris canariensis* zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und schließlich mit Wasser. Der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt und das Filtrat vom Bleiniederschlag mit Ammoniak neutralisiert; der so erhaltene Niederschlag

wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei „mit Kalk behandelt, welches dadurch klar blieb, sich aber beim Erwärmen trübte und beim Erkalten wieder klärte. Dieses Verhalten deutet auf die Anwesenheit von Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Fr. M. Braude und V. v. Rakowiecki (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 13, 33, 1864) extrahierte Bucheckern, *Fagus sylvatica*, zunächst mit Äther, dann mit warmem Alkohol und zuletzt mit kaltem Wasser. Der wässrige Extrakt wurde eingedampft und durch Behandeln des Rückstandes mit Alkohol Pektinstoffe entfernt. Die alkoholische Lösung wurde von Alkohol befreit und die wässrige Lösung mit Bleiacetat gefällt. Der Bleiniederschlag wurde mit Essigsäure behandelt, worin er sich zum Teil löste, das Filtrat mit Ammoniak versetzt und der hellgelbe Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid gab „mit Kalkwasser durch die erst beim Erwärmen eingetretene Trübung, welche in der Kälte wieder verschwand, die Gegenwart von Citronensäure zu erkennen“.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Dieterich (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 15, 201, 1866) extrahierte zerkleinerte Edelkastanien, *Castanea vesca*, zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und weiterhin mit kaltem Wasser; der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt und im Filtrat vom Bleiniederschlag durch Sättigen mit Ätznatron ein weiterer Bleiniederschlag erzeugt. Dieser wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt; im Filtrat vom Bleisulfid fanden sich Spuren von eisengrüner Gerbsäure, auch noch Citronensäure, „denn mit Kalkwasser übersättigt, entstand beim Kochen eine Trübung, die beim Erkalten wieder verschwand“.

Der Nachweis ist unzureichend.

V. Leutner (Pharm. Zeitschr. f. Rußland 10, 687, 1871) digerierte mit Alkohol und Äther erschöpfte Vanille, *Vanilla planifolia*, mit Wasser und fällte den wässrigen Auszug mit Bleiacetat. Der Bleiniederschlag wurde dann durch Auskochen mit Wasser von äpfelsaurem Blei befreit. Der in Wasser unlösliche Teil des Bleiniederschlags wurde mit Essigsäure digeriert und filtriert; aus dem essigsauren Filtrat wurden durch Ammoniak die Bleisalze wieder ausgefällt und nach dem Abfiltrieren in alkoholischer Suspension mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde eingedampft; in dieser Flüssigkeit brachte Chlorcalcium und Kalkwasser einen Niederschlag hervor, welcher sich in Chlorammonium wieder löste; die von diesem Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit gab beim Erhitzen eine Trübung.

Der Nachweis ist unzureichend.

Gräber (Neues Jahrb. f. Pharm. 36, 209, 1871) untersuchte die Säuren der Preiselbeeren, *Vaccinium vitis idaea*; über ihren Nachweis findet sich nur: „Was die Natur der freien Säure anbelangt, so ist sie in der Hauptsache als Citronensäure anzunehmen. Hierfür spricht nicht nur das Verhalten des Kalksalzes, von welchem als charakteristisch angegeben wird, daß es beim Kochen seiner wässrigen Lösung sich ausscheidet, wie ich es auch bei dem durch reinen kohlen-sauren Kalk neutralisierten Saft gefunden habe. Andererseits spricht für Citronensäure auch die Kristallform, aus der durch Schwefelwasserstoff aus dem Bleisalz abgeschiedenen Säure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Thomas D. McElhenie (Amer. Journ. of Pharm. 44, 198, 1872) versetzte eine Gallone des Saftes reifer Tomaten, *Solanum Lycopersicum*, in heißem Zustande so lange mit Calciumcarbonat, bis die Gasentwicklung aufhörte. Die Kalksalze wurden mit Schwefelsäure zersetzt und das Filtrat vom Gips eingedampft. Die nach mehrwöchigem Stehen abgeschiedene kristalline Masse, die durch braunen Extraktivstoff verunreinigt war, wurde nach dem Gang von *Wills* Tabellen untersucht und Citronensäure, Äpfelsäure und Oxalsäure gefunden. Um die Säuren zu trennen, wurde die Masse mit Wasser aufgenommen, die Lösung mit Kalkwasser neutralisiert und gekocht, bis Calciumcitrat ausfiel. Dieses wurde mit Schwefelsäure zerlegt, das Filtrat vom Calciumsulfat eingedampft und sich selbst überlassen. Es schieden sich Kristalle ab, die aber mit einer farbigen zähen Masse verunreinigt waren.

Der Nachweis ist unzureichend.

Gräber (Neues Jahrb. f. Pharm. 89, 193, 1873) gibt im Anschluß an seine frühere Arbeit eine Methode zur Darstellung von Citronensäure aus Preiselbeeren. Die Beeren werden ausgepreßt, der Saft mit Leim geklärt, mit Kalk neutralisiert und gekocht, bis aller zitronensaurer Kalk ausgefällt ist; das Kalksalz wird aus Wasser umkristallisiert und durch Schwefelsäure die Citronensäure in Freiheit gesetzt. Er fand, daß die Säure der Preiselbeeren nicht aus reiner Citronensäure, sondern zu einem Viertel bis einem Drittel aus Äpfelsäure besteht; die Beeren scheinen um so mehr Citronensäure zu enthalten, je reifer sie sind. Aber auch in den völlig reifen Beeren fehlt die Äpfelsäure nicht ganz.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Schulze (Landw. Jahrb. 5, 840, 1876) fällte den wässerigen Extrakt der Lupinen mit Bleiacetat und behandelte den Bleiniederschlag zur Extraktion des zitronensauren Bleies mit Ammoniak, wobei der größte Teil des Niederschlags sich auflöste. „Die aus dieser Lösung durch angemessene Behandlung abgeschiedene freie Säure gab die charakteristischen Reaktionen der Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

v. Dragendorff (Arch. d. Pharm. 212, 121, 1878) extrahierte *Ubyaea Schimperii* mit Wasser, fällte mit Bleiacetat und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Im Filtrat vom Bleisulfid wurde durch Kalkwasser beim Erwärmen ein Niederschlag erzeugt und deshalb auf Citronensäure geschlossen.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. O. v. Lippmann (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 12, 1649, 1879) gewann aus den Kalkniederschlägen der Zuckerfabrikation durch Zerlegen mit Schwefelsäure, Aufnehmen mit Alkohol und Füllen mit Äther Citronensäure. Nähere Kennzeichnung fehlt.

Der Nachweis ist unzureichend.

H. van Allen (Amer. Journ. of Pharm. 52, 441, 1880) extrahierte drei Unzen Rinde von *Viburnum prunifolium* zunächst mit Äther und perkolierte dann mit Wasser. Das saure Perkolat gab mit Kalkwasser einen Niederschlag (Oxalsäure); das Filtrat gab beim Kochen einen zweiten Niederschlag, der abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen wurde; er löste sich klar in Ammoniak; beim Kochen der Lösung wurde ein Niederschlag von zitronensaurem Kalk erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

George A. Ferdinand [Amer. Journ. of Pharm. 52, 295, 1880; Justs Botan. Jahresber. 8 (1), 385, 1880] kochte Kranbeerensaft, *Vaccinium macrocarpum*, und neutralisierte durch Zusatz von Calciumcarbonat und Kalkmilch; der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kochendem Wasser gewaschen und getrocknet. In der wässrigen Lösung des Niederschlags entstand auf Zusatz von Calciumchloridlösung beim Kochen ein weißer Niederschlag. Silbernitratlösung gab einen farblosen Niederschlag, der sich erst nach längerem Kochen schwärzte. Auf Zusatz von Permanganat trat beim Kochen keine Reduktion ein. Auf Zusatz von Calciumhydroxydlösung trat in der Kälte keine Reduktion ein, beim Kochen bildete sich jedoch ein weißer Niederschlag. Aus diesen Reaktionen wird auf die Gegenwart von Citronensäure geschlossen.

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Grüning (Arch. d. Pharm. 220, 594, 1882) extrahierte je 200 g der Rhizome der weißen und gelben Teichrose, *Nymphaea alba* und *luteum*, mit Wasser, fällte zunächst die Gerbsäure durch Kupferacetat aus, entkupferte durch Schwefelwasserstoff und fällte dann mit Bleiacetat. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Natronlauge neutralisiert und mit Chlorcalcium und Kalkwasser versetzt. Der verhältnismäßig große Niederschlag enthielt die Kalksalze der Weinsäure und Oxalsäure. „Das Filtrat vom Kalkniederschlag schied beim Erhitzen zitronensauren Kalk ab; die davon abfiltrierte Lösung wurde mit Alkohol fraktioniert gefällt; zuerst fiel Calciumcitrat, dann äpfelsaurer Kalk aus.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Nessler und *Barth* (Zeitschr. f. analyt. Chem. 21, 63, 1882) dampften 100 ccm Wein, *Vitis vinifera*, ein, behandelten den Rückstand mit Alkohol, verdampften letzteren und lösten den Rückstand in Wasser zu 20 ccm. Die Lösung wurde mit Kalkmilch abgestumpft, filtriert, das Filtrat auf 100 ccm gebracht, mit 0,5 bis 1 ccm Bleiacetatlösung gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit dünner Kalkmilch alkalisch gemacht, um die Phosphorsäure abzuscheiden, das Filtrat mit wenig Essigsäure angesäuert und $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde stehen gelassen, um eventuell vorhandene Weinsäure als weinsauren Kalk abzuscheiden. Das Filtrat wurde zur Trockne eingedampft, mit heißem Wasser aufgenommen und konzentriert, bis zitronensaurer Kalk ausfiel. „Nach dieser Methode kann man 20 mg zugesetzte Citronensäure zu 100 ccm Wein deutlich nachweisen; wir erhielten einen Niederschlag, der 13 mg Citronensäure entsprach.“ Zum sicheren Nachweis der Citronensäure dürfte die Methode ungeeignet sein.

Der Nachweis ist unzureichend.

Kossowitsch (Journ. d. russ. physik.-chem. Ges. 19, 272, 1887) versetzte Moosbeerensaft, *Vaccinium oxycoccos*, mit Kaliumchloridlösung; ein Niederschlag entstand nicht; Weinsäure war also nicht zugegen; der mit Ammoniak neutralisierte Saft gab auf Zusatz von Calciumchloridlösung keinen Niederschlag; Oxalsäure war also abwesend. Der mit Kaliumcarbonat neutralisierte Saft gab beim Kochen auf Zusatz von Calciumchloridlösung einen Niederschlag von Calciumcitrat; das Filtrat von diesem gab auf Zusatz von Alkohol keinen Niederschlag; Äpfelsäure war also abwesend.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. Campani und S. Grimaldi (Gaz. chim. ital. 18, 441, 1888) extrahierten den Samen der weißen Lupine, *Lupinus albus*, mit Wasser, entfernten Protein- und Pektinstoffe und untersuchten nun nach der von Post (Traité complet d'analyse chimique) angegebenen Methode. Aus dem gewonnenen Calciumcitrat wurde die Citronensäure in schönen Kristallen erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (Pharm. Rundsch. New York 8, 59, 1890) fällte den wässrigen Blätterauszug von *Cephalanthus occidentalis* mit Bleiacetat, kochte die Bleisalze mit Alkohol aus und zersetzte dann mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Man erhält so schon eine ziemlich gereinigte Säure, aus deren wässriger Lösung, wenn man mit etwas Chlorammon und einem Überschuß von Chlorcalcium und Ammoniak längere Zeit kocht, ein reichlicher Niederschlag von Calciumcitrat sich absetzt.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (Pharm. Rundsch. New York 8, 107, 1890) rührte zerquetschte Kranbeeren mit heißem Wasser an, versetzte mit einem geringen Überschuß von Kalkmilch und fügte dann einen geringen Überschuß von Salzsäure hinzu. Dann wurde abfiltriert, ausgewaschen und das Filtrat unter gelindem Erwärmen mit überschüssigem Ammoniak versetzt; die abgeschiedenen Flocken wurden abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand unter Zusatz von Ammoniak mit siedendem Wasser übergossen. Das nicht gelöste Calciumcitrat wurde abfiltriert und mit heißem Wasser gewaschen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Ölze (Sitzungsber. d. physik.-med. Soc. in Erlangen, Heft 22, S. 17, 1890) zog Frucht und Blätter der Preiselbeeren, *Vaccinium vitis idaea*, mit Wasser aus, fällte den wässrigen Auszug mit Bleiacetat und schüttelte das Filtrat vom Bleisulfid mit Äther aus. Der nach dem Abdestillieren des Äthers verbleibende Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, mit Natriumcarbonat neutralisiert, Kalkwasser und ein Überschuß von Calciumchlorid zugesetzt. Hierbei entstand ein Niederschlag, weswegen auf Weinsäure geschlossen wurde; das Filtrat vom weinsauren Kalk gab beim Kochen einen weiteren Niederschlag, weswegen auf Citronensäure geschlossen wurde.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (Pharm. Rundsch. New York 8, 262, 1890) untersuchte in der gleichen Weise wie *Cephalanthus occidentalis* auch *Rhus aromatica* und fand angeblich Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Belzung (Journ. de Botanique 5, 25, 1891) ließ junge Pflanzenteile der weißen Lupine, *Lupinus albus*, sich in einer Lösung von Calciumcitrat oder Calciumacetat (1 bis 3 g im Liter) entwickeln; unter den innegehaltenen Bedingungen vollzog sich die Keimung innerhalb mehrerer Wochen. „Betrachtet man die Zellen der Lupinen nach einigen Tagen Einfluß von Calciumnitrat unter dem Mikroskop, so überwuchern nach einigen Minuten zahlreiche kugelförmige Kristallhaufen, gebildet von kurzen Nadeln, mehr oder weniger gepreßt, ebenso häufig isolierte Nadeln oder Büschel die ganze schwammartige Zellsubstanz. Vergleiche mit dargestelltem Calciumcitrat ergaben Übereinstimmung.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Wilhelm Keim (Zeitschr. f. analyt. Chem. **30**, 401, 1891) versetzte den Saft der Sauerkirschen, *Prunus cerasus*, mit frisch gefälltem kohlen-sauren Kalk in nicht zu großem Überschuß, engte stark ein und fällte die Kalksalze durch Alkohol. Diese wurden dann mit kohlen-saurem Natron gekocht und dadurch in eine Lösung der Natronsalze umgewandelt. „Die durch Essigsäure neutralisierte Lösung wurde, um Äpfelsäure und Bernstein-säure in Lösung zu halten, mit Ammoniumacetat versetzt und darauf mit Calciumacetat bei Siedehitze behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und unter Zuhilfenahme von Essigsäure gelöst, mit Blei-acetat gefällt, filtriert, gewaschen, in Wasser suspendiert und durch Schwefel-wasserstoff zerlegt. Das Filtrat wurde verdunstet, mit 90proz. Alkohol ausgezogen und die Lösung abermals zur Trockne gebracht. Mit der auf diese Weise isolierten Citronensäure konnten die charakteristischen Reak-tionen ausgeführt werden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Salomon Frankfur (Landw. Versuchsstat. **43**, 149, 1894) fällte den wässerigen Auszug ungekeimter Hanfsamen, *Canabis sativa*, mit Blei-acetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, fällte noch zweimal mit Bleiessig und zerlegte den Bleiniederschlag wieder; das Filtrat wurde „konzentriert mit Kalkwasser gesättigt und eine Zeitlang gekocht; es schied sich ein kristallinisches Kalksalz aus, das in Chlorammonium-lösung löslich war. Die Reaktion beweist das Vorhandensein von Citronen-säure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Nacken (Forschungsberichte über Lebensmittel und ihre Beziehungen zur Hygiene, über forense Chemie und Pharmakognosie, **2**, 358, München, 1895) fällte 4 Liter Heidelbeersaft, *Vaccinium myrtillus*, mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und entfernte aus dem Filtrat vom Bleisulfid durch Kochen mit Tierkohle den Farb- und den Gerbstoff. „Zur Trennung der einzelnen Säuren wurde das Verhalten ihrer Kalksalze benutzt. Ein Zusatz von Chlorcalciumlösung und Kalkwasser zum farblosen Filtrat rief keinen Niederschlag hervor, wodurch die Abwesenheit von Oxalsäure und Weinsäure nachgewiesen war. Eine alko-holische Kaliumacetatlösung gab ebenfalls auch nach längerem Kochen keine Fällung. Zur Abscheidung von Citronensäure wurde zum Sieden erhitzt, wobei sich eine reichliche Fällung zeigte, die auf dem Filter mit siedend heißem Wasser ausgewaschen wurde. Nach dem Eindampfen des Filtrats auf wenige Kubikzentimeter trat die Ausscheidung von äpfel-saurem Kalk ein, die durch Alkoholzusatz vervollständigt wurde.“

„Zur Identifizierung wurden die Niederschläge wie folgt weiter be-handelt: Die erste Fällung, die zu einem kleinen Teil aus kohlen-saurem Kalk bestand, wurde mit kaltem Wasser ausgelaugt, die Lösung mit Essig-säure schwach angesäuert und mit Bleiacetat gefällt. Durch Zersetzung der ausgewaschenen Bleifällung mit Schwefelwasserstoff wurde eine reine Citronensäurelösung erhalten, die auf dem Wasserbade zur Kristallisation eingedampft wurde. Die erhaltenen Kristalle wurden als Citronensäure durch den Schmelzpunkt und das charakteristische Verhalten ihres Bariumsalzes erkannt. Selbst nach wochenlangem Stehen blieb das Barium-salz amorph; dagegen zeigte dasselbe ein kristallinisches Gefüge, wenn es sich aus einer schwach mit Essigsäure angesäuerten Lösung abschied; unter dem Mikroskop betrachtet, in Gestalt kleiner, teils zu dichten Büscheln vereinigter Nadelchen.“

Die wenigen qualitativen Proben dürften nicht zureichend sein, um die Anwesenheit von Citronensäure in den Heidelbeeren sicherzustellen. *Der Nachweis ist unzureichend.*

A. Berg und C. Gerber [Bull. de la Soc. chim. de Paris (3) 15, 1050, 1896] wiesen Citronensäure und Äpfelsäure in Mesembryanthemum auf folgende Weise nach: die Pflanzenteile wurden mit Wasser ausgezogen, der Extrakt mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei ainedampft. Gibt die Lösung mit Kalkwasser einen Niederschlag, so wird die ganze Lösung bis zur schwach alkalischen Lösung damit versetzt, der Niederschlag abfiltriert und mit Essigsäure behandelt; bleibt ein unlöslicher Rückstand, so ist dies Calciumoxalat. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und nach M. Mohlow [Bull. de la Soc. chim. (3) 4, 728] mit einer Lösung von 1proz. Resorcin in Schwefelsäure auf Weinsäure geprüft; Rotfärbung zeigt diese Säure an. Das Filtrat vom Calciumoxalat enthält noch Calciumcitrat und -malat. Das Calcium wird mit Ammoniumoxalat ausgefällt und das Filtrat eingedampft. Ein Teil wird auf Citronensäure in folgender Weise untersucht: Die Trockensubstanz wird mit dem fünf- bis sechsfachen Gewicht Schwefelsäure 66° Bé 1 bis 1,5 Stunden auf 50 bis 60° erhitzt, abgekühlt, das fünf- bis sechsfache Volumen Wasser hinzugefügt, mit Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung in zwei Teile geteilt. Der Rückstand des einen Teiles wird mit Wasser aufgenommen; tritt auf Zusatz von Eisenchloridlösung Violettfärbung ein, so ist Citronensäure vorhanden. Der Rückstand des anderen Teiles wird zu einer sehr verdünnten Natriumnitroprussidlösung, zu der ein Tropfen konzentrierter Sodalösung gegeben wurde, hinzugefügt; Rotorangefärbung zeigt Citronensäure an. „Die Anwendung dieser Methode erlaubte uns, Citronensäure und Äpfelsäure in einer großen Anzahl von Pflanzen und besonders in Mesembryanthemum zu entdecken, in welchem sie noch nicht beobachtet worden war.“

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Bornträger (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1, 160, 1898) sieht den Niederschlag, den er aus dem Saft der Granatäpfel, Punica granatum, nach dem Neutralisieren mit carbonatfreiem Alkali durch Calciumchloridlösung in der Hitze erhält, als zitronensauren Kalk an und ermittelt nach dem Veraschen des Niederschlags die Menge der Citronensäure durch Titration der Asche.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. Paris (Chem.-Ztg. 26, 248, 1902) bestimmte nach der Methode von Bornträger und Paris (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1, 158, 1898) in unreifen Erdbeeren, Fragaria vesca, die Citronensäure als zitronensaures Calcium.

Der Nachweis ist unzureichend.

I. O. Schlotterbeck und H. C. Watkins (The Journ. of the Amer. Chem. Soc. 25, 600, 1903) extrahierten die vollständigen zweijährigen Pflanzen des kletternden Erdrauchs, Adlumia cirrhosa, mit Wasser, fällten mit Bleiacetat, zerlegten den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und dampften das Filtrat vom Bleisulfid zur Trockne ein. Der Rückstand wurde mit Alkohol ausgekocht; aus der alkoholischen Lösung setzte sich beim Abkühlen ein kalkhaltiger Niederschlag ab. Dieser wurde in Essigsäure gelöst und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung behandelt, wobei ein Silberspiegel entstand. Die freie Säure wurde in der Kälte durch

Kalkwasser gefällt, aus welcher Reaktion auf Citronensäure geschlossen wird. Die freie Säure kristallisierte in den rhombischen Prismen der Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

R. Kunz und F. Adam (Zeitschr. d. österr. Apothekerver. 44, 243, 1906) bestimmten in den Johannisbeeren nach einem besonderen Analysengang die Menge der Citronensäure quantitativ. Die Methode ist zum qualitativen Nachweis der Citronensäure nicht ausreichend.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Schulze (Landw. Versuchsstat. 67, 83, 1907) entfettete die Samen der Zirbelkiefer, Pinus cembra, mit Äther, stellte dann einen wässerigen Auszug her, fällte diesen mit Bleiacetat und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde mit Strontiumhydroxyd neutralisiert, wobei eine Fällung entstand. „Die von dieser Fällung abfiltrierte Flüssigkeit lieferte beim Eindunsten eine dem Anschein nach kristallinische Abscheidung, die abfiltriert wurde; das Filtrat gab bei weiterem Einengen noch ein neues Quantum der gleichen Substanz. Dieses Produkt glich im Aussehen der Abscheidung, die man erhält, wenn man eine verdünnte wässrige Citronensäurelösung in der gleichen Weise behandelt. Die aus dieser Strontiumverbindung mit Schwefelsäure in Freiheit gesetzte Säure gab die von O. v. Spindler (Chem.-Ztg. 28, 148) beschriebene Reaktion auf Citronensäure. Diese Reaktion beruht auf dem Verhalten der Citronensäure gegen Quecksilbersulfat und Bichromatlösung.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Marmaduke Barrowcliff und Frank Tutin (Journ. of the Chem. Soc. of London 91, 1915, 1907) extrahierte die wässerigen Auszüge der Wurzel von Morinda Longiflora mit Äther und behandelte die so gewonnenen Säuren mit Bariumacetatlösung, bis sich kein Niederschlag mehr bildete; das Filtrat vom Barytniederschlag wurde mit basischer Bleiacetatlösung gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid eingengt, mit Sägemehl gemischt, getrocknet und mit Äther extrahiert. Der Rückstand der Ätherextraktion „aus Essigester unkristallisiert, schmolz bei 151 bis 152° und gab die Reaktionen der wasserfreien Citronensäure“.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Muttelet (Ann. d. Falsific. 2, 383, 1909) bestimmte in den Erdbeeren, Fragaria vesca, Himbeeren, Rubus idaeus, und Johannisbeeren, Ribes rubrum, nach einem besonderen Analysengang die Menge der Citronensäure; es ist schon in den vorhergehenden Arbeiten darauf hingewiesen worden, daß dieser Analysengang zum sicheren Nachweis der Citronensäure nicht geeignet ist.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Scurti und G. de Plato (Le Stazioni sperimentali agrarie italiane 41, 435, 1908) behandelten den Bleiniederschlag des Orangensaftes bei 70° mit Essigsäure, wodurch äpfelsaures Blei gelöst wurde, zerlegten den unlöslichen Teil mit Schwefelwasserstoff und teilten das Filtrat vom Bleisulfid in zwei Teile; in dem einen Teil wurde Bernsteinsäure als basisches Ferrisalz nachgewiesen; „der andere Teil wurde auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen gebracht, drei Volumina Wasser hinzugefügt und nun

Bariumacetatlösung hinzugesetzt; die sofortige Abscheidung von Bariumcitrat erweist die Gegenwart von Citronensäure“.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. M. Albahary (Ann. d. Falsific. 5, 147, 1912; C. r. 144, 1232, 1907) bestimmte nach einem besonderen Analysengang in einer großen Reihe von Früchten die Menge der Citronensäure und Äpfelsäure. Citronensäure wurde in folgenden Früchten gefunden: Citronen, Citrus Limonum, Äpfel, Pirus malus, Birne, Pirus communis, Pflaume, Prunus domestica, Reineclaude, Prunus italia, Pfirsich, Prunus persica, Aprikose, Prunus armeniaca, Kirsche, Prunus avium, Sauerkirsche, Prunus cerasus, Weintrauben, Vitis vinifera, Erdbeeren, Fragaria vesca, Himbeere, Rubus idaeus, Johannisbeere, Ribes rubrum, schwarze Johannisbeeren, Ribes nigrum, Moosbeeren, Vaccinium oxycoccos. In den vorhergehenden Arbeiten wurde schon darauf hingewiesen, daß dieser Analysengang zum sicheren Nachweis der Citronensäure nicht geeignet ist.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Wooslobo und J. Zellner (Monatsh. f. Chem. 85, 1525, 1914) untersuchten den wässerigen Auszug der Tabakwurzeln, Nicotiana Tabacum, nach der Methode von Albahary. Die Reaktion von Denigès trat in sehr kräftiger Weise und die von Stahre (Zeitschr. f. analyt. Chem. 8, 195, 1897) ganz deutlich auf, „so daß die Anwesenheit von Citronensäure und Äpfelsäure höchst wahrscheinlich ist“.

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Hartwich und E. Zwicky (Apotheker-Ztg. 29, 936, 1914) versuchten, in Mesembryanthemum expansum und M. tortuosum Citronensäure mikrochemisch nachzuweisen. „In den Blättern der trockenen Droge fielen neben Raphiden reichliche weiße Punkte auf, die sich als kugelige Gebilde von kristallinischer Struktur erwiesen. Die mikrochemische Untersuchung wies Magnesium, Phosphorsäure und Citronensäure in ihnen nach.“ Die Citronensäure wurde in einem wässerigen Auszug der Droge noch wie folgt nachgewiesen: 1. Mit Silbernitrat (Behrens, Mikrochemische Analyse, S. 52, 1897) entstand eine weiße flockige Fällung, die beim Erwärmen sich teilweise löste und nach dem Versetzen mit Essigsäure beim Erkalten kleine linsenförmige Kristalle abscheidet; daneben waren häufig trübe Kugeln und quadratische Blättchen wahrnehmbar; diese verschiedenen Gebilde sind charakteristisch für Silbercitrat.“ 2. „Mit Wismutnitrat entstand zuerst eine flockige Fällung, die später kristallinisch wurde und die für Wismutcitrat charakteristischen linsen- und stäbchenförmigen Kristalle zeigte.“ 3. „Mit Kupfersulfat, 1 %, und Kupferacetat, 5 %, wurden die charakteristischen Sphäroliten und Sternchen von Kupfercitrat sehr schön erhalten.“ 4. „Mit Denigès Reagens entstand nach längerem Stehen ein weißer kristalliner Niederschlag, der sedimentiert wurde und kleine rhombische Kriställchen erkennen ließ.“ 5. „Mit Stahres Reagens entstanden zuerst gallertartige Fällungen, die später kristallinisch wurden und deutlich die charakteristischen Briefkuvertformen zeigten.“

Der Nachweis ist unzureichend.

T. C. N. Bröksmit (Pharm. Weekblad voor Nederland 58, 1033, 1916) wendet zum Nachweis der Pflanzensäuren zunächst die Jodoformprobe an; fällt diese positiv aus, so kann Äpfelsäure und Citronensäure vorhanden sein. Gibt der Saft jetzt auf Zusatz von Bariumacetat eine kristalline Abscheidung, so ist Citronensäure zugegen, da Äpfelsäure unter

gleichen Umständen keinen Niederschlag liefert. Auf diese Weise wurde im Citronensaft, *Citrus Aurantium*, Apfelsinensaft, *Citrus Limonum*, und im Pfirsichsaft, *Prunus Persica*, Citronensäure nachgewiesen. Im Tamarindensaft, *Tamarindus indica*, und Apfelsaft, *Pirus malus*, konnte Citronensäure nicht aufgefunden werden. Der Apfelsaft enthält nun, wie wir in einer besonderen Arbeit zeigen werden, recht erhebliche Mengen Citronensäure, so daß die Methode unzulänglich ist.

Der Nachweis ist unzureichend.

W. D. Bigelow und P. B. Dunbar (The Journ. of Ind. and Eng. Chem. 9, 762, 1917) untersuchten verschiedene Früchte nach der Methode von Pratt (U. S. Dept. Agr. Bur. of Chem. Circular 88, Zitat war nicht zugänglich), indem sie die Säure als Bariumcitrat fällten und durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in Aceton überführten und dieses in *Denigès* Reagens auffingen. „Die *Prattsche* Methode wurde in den meisten Fällen angewandt, aber nur qualitative Schlüsse daraus gezogen.“ Es wurde so Citronensäure gefunden in einigen Birnenarten, Johannisbeeren, *Ribes rubrum*, Stachelbeeren, *Ribes grossularia*, Preiselbeeren, *Vaccinium macrocarpum*, Granatäpfel, *Punica granatum*, Heidelbeeren, *Vaccinium Myrtillus*.

Der Nachweis dürfte unzureichend sein.

Bornträger (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 5, 147, 1902) kochte Früchte mit Wasser aus, erwärmte die Filtrate mit Chlorcalcium und etwas Essigsäure, wobei niemals oxalsaures Calcium niederfiel. „Beim späteren Neutralisieren mit Ammoniak fielen zwar meistens geringe bis starke, gelbe bis braunrote Flocken nieder, aber es schied sich kein wein- oder traubensaures Calcium und beim darauf folgenden Aufkochen fast nie zitronensaures Calcium ab. Nur in den unreifen Früchten der japanischen Mispel, *Erybotrya japonica*, wurde ziemlich viel Citronensäure gefunden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Hülger und R. Gross (Landw. Versuchsstat. 33, 178, 1887) untersuchten verschiedene Organe des Weinstocks, *Vitis vinifera*, auf die darin enthaltenen Säuren. Aus jungen Trieben, Ranken und unreifen Früchten wurden wässrige Auszüge hergestellt und aus diesen in der Hitze durch Essigsäure die Eiweißstoffe entfernt; das Filtrat wurde in der Kälte mit basischem Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Bleisulfid abfiltriert und das Filtrat mit Tierkohle möglichst entfärbt; die Flüssigkeit wurde dann eingedampft und der Rückstand der Kristallisation überlassen; nach längerem Stehen schieden sich reichliche Kristallmengen ab, die abgesaugt und getrocknet wurden. Um in diesen Kristallisationen die darin enthaltenen Säuren nachzuweisen, wurde nach zwei verschiedenen Methoden verfahren.

Erste Methode. Zuerst wurde in alkoholischer Lösung mit essigsauerm Kali die Weinsäure als Bitartrat abgeschieden, dann Kalkwasser bis zur schwach sauren Reaktion hinzugefügt und dadurch die Oxalsäure entfernt. „Nun wurde die Lösung vollständig mit Kalkwasser neutralisiert und wiederum längere Zeit stehen gelassen, um weinsäuren, oxalsäuren und zitronensäuren Kalk abzuscheiden. Dieser wurde abfiltriert und der Niederschlag durch etwa 10 Minuten andauerndes Erwärmen auf dem Wasserbade mit Kalilauge getrennt. Weinsaurer Kalk geht in Lösung, zitronen- und oxalsaurer nicht . . .“ „Um diese zu trennen, wurde zu dem Rückstand Essigsäure gefügt, wodurch zitronensaurer Kalk in Lösung ging, während der nun bleibende Rückstand nur noch Oxalsäure enthielt.“

Zweite Methode. „Der zweite Teil der gesättigten Säurelösung wurde zunächst mit Ammoniak neutralisiert und bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, dann nochmals mit Ammoniak neutralisiert, ungefähr das zweifache Volumen Alkohol zugegeben und die gesamte Masse stehen gelassen. Nach mehreren Tagen hatte sich eine Kristallmasse abgeschieden, die aus weinsaurem, oxalsaurem und zitronensaurem Ammon bestehen konnte. Zur Trennung wurde mit Wasser aufgenommen, mit Essigsäure angesäuert und mit essigsauerm Kali, gelöst in Alkohol, die Weinsäure ausgefällt.“ Aus dem Filtrat wurde mit ein paar Tropfen Chlorcalcium die Oxalsäure abgeschieden, nachdem „die Mutterlauge mit Kalkwasser neutralisiert und mit gleichen Teilen Alkohol versetzt war, schied sich ein nicht allzu voluminöser Niederschlag ab, der nur Citronensäure sein konnte“. „Das Filtrat des Ammoniakniederschlags konnte nur aus Citronensäure und Äpfelsäure bestehen. Zur Trennung dieser beiden wurde mit Calciumhydroxyd neutralisiert und nach Zusatz von Chlorcalcium längere Zeit im Sieden gehalten. Schied sich zitronensaurer Kalk während des Kochens ab, so wurde er abfiltriert und durch Zusatz von wenig Alkohol die noch in Spuren vorhandene Citronensäure abgeschieden und dann durch überschüssigen Alkohol die Äpfelsäure als äpfelsaurer Kalk gefällt.“ „Die Erkennung der Citronensäure in den erhaltenen Fällungen war auf folgende Reaktionen basiert: Schwerlöslichkeit des Bariumsalzes, Untersuchung des reinen Bariumsalzes, Inaktivität der Citronensäure gegen das polarisierte Licht.“ „Die Resultate der Untersuchung haben die Gegenwart folgender Säuren festgestellt: 1. In den Ranken: Weinsäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, Citronensäure, Bernsteinsäure. 2. In den Blättern: Weinsäure in großer Menge, Äpfelsäure, Oxalsäure, Citronensäure.“

Die analytischen Operationen sind nur zum Teil verständlich. Die angegebenen qualitativen Reaktionen genügen keineswegs, um die Gegenwart von Citronensäure sicherzustellen.

Der Nachweis ist unzureichend.

R. Kissling (Chem.-Ztg. 22, 2, 1898) bestimmt im Tabak, Nicotiana Tabacum, die Citronensäure auf folgendem Wege: 10 g Tabakpulver werden mit überschüssiger verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit Bimssteinpulver gemischt und mit Äther extrahiert. Dem Extrakt werden durch Schütteln mit Wasser die Säuren entzogen und der Äther verdampft. In der wässrigen Lösung ist jetzt Essigsäure, Oxalsäure, Äpfelsäure und Citronensäure enthalten. Zunächst wird die Oxalsäure durch Calciumacetat als Calciumoxalat ausgefällt. Zu dem Filtrat wird so lange verdünnte Bleiacetatlösung hinzugefügt, bis ein sich sofort in Essigsäure auflösender Niederschlag entsteht. In diesem Augenblick ist die Citronensäure fast vollständig ausgefällt. Das zitronensaure Blei wird abfiltriert, verascht und aus der Menge des Bleioxyds die Citronensäure berechnet.

Zum Nachweis der Citronensäure ist die Methode ungeeignet.

R. Kissling (Chem.-Ztg. 23, 3, 1899) wendet zur quantitativen Bestimmung von Oxalsäure, Äpfelsäure und Citronensäure im Tabak, Nicotiana Tabacum, das folgende Verfahren an: der mit Schwefelsäure angesäuerte Tabak wird mit Äther extrahiert, die Säuren in Wasser aufgenommen und die Lösung mit Barytlösung titriert. Durch Zusatz von 20proz. Alkohol wird zunächst Bariumoxalat und -citrat fast vollständig ausgefällt und durch Zusatz von 70proz. Alkohol dann das Bariummalat. In einer besonderen Probe wird die Menge der Oxalsäure ermittelt. Nach

Kissling ist diese Methode keine quantitative, jedoch eine ziemlich befriedigende. Bei Vergleichsversuchen wurden annähernd die zugesetzten Mengen der drei Säuren wiedergefunden.

Zum Nachweis der Citronensäure ist diese Methode unzureichend.

R. G. Pelly (The Journ. of the Soc. of chem. Ind., London, 82, 778, 1913) erhielt aus dem Extrakt der Früchte des Affenbrotbaumes, *Adansonia digitata*, einen Bleiniederschlag und aus diesem nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff eine kristalline Masse, die hauptsächlich aus Citronensäure bestand. Sie wurde durch ihr Calciumsalz und durch den Methylester vom Schmelzpunkt 77° gekennzeichnet.

Es dürfte wohl wahrscheinlich sein, daß in den Früchten des Affenbrotbaums Citronensäure enthalten ist.

Arbeiten, in denen die Anwesenheit von Citronensäure in Pflanzen durch quantitative Analyse der Säure selbst oder ihrer Abkömmlinge festzustellen versucht wird.

A. Chodnew (Ann. d. Chem. 53, 283, 1845) extrahierte unreife Stachelbeeren, *Ribes grossularia*, mit Wasser, fällte mit Bleiessig, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und sättigte das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkmilch; beim Kochen entstand ein Niederschlag. „Die schwer lösliche Kalkverbindung bestand meistens aus basisch zitronensaurem Kalk und einer sehr geringen Menge neutralem äpfelsauren Kalk, der wegen seiner großen Löslichkeit von dem ersteren Salz durch Auswaschen mit Wasser getrennt wurde. Der basisch zitronensaure Kalk, in Wasser gelöst, mit salpetersaurem Silber behandelt, gab ein zitronensaures Salz, dessen Analyse und Atombestimmung auf ein zitronensaures Doppelsalz von Kalk und Silberoxyd schließen ließ.“ $C_{12}H_5O_{11}$, 2 AgO, 2 CaO. „Diese sonderbare Verbindung, die zweimal erhalten wurde, erfordert, daß die Untersuchung der in unreifen Stachelbeeren vorkommenden Säuren noch einmal wiederholt werde.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Robert Schwarz (Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 6, 456, 1851) fällte den wässrigen Auszug des Waldmeisters, *Asperula odorata*, mit Bleiacetat, behandelte den Bleiniederschlag mit Essigsäure, zerlegte das darin Unlösliche mit Schwefelwasserstoff und teilte das Filtrat vom Bleisulfid in drei Teile. Der eine Teil wurde mit Bleiacetat vollständig ausgefällt und die anderen Teile hinzugesetzt. Der Niederschlag, welcher zum größten Teil aus Bleiphosphat und -sulfat bestand, wurde nach längerem Digerieren abfiltriert, das Filtrat mit Bleiacetat vollständig ausgefällt, der Niederschlag mit Essigsäure behandelt, vom Ungelösten abfiltriert und die Lösung mit dreibasisch essigsaurem Blei gefällt. Der Niederschlag wurde mit Weingeist ausgewaschen und bei 100° getrocknet. Das Bleisalz gab bei der Elementaranalyse Werte, welche auf die Formel $C_{56}H_{31}O_{49}(PbO)_{13}$ stimmten. Verfasser nimmt an, daß der Niederschlag aus einem Gemisch von verschiedenen basischen Salzen der Citronensäure besteht und gibt auch eine Formel dafür an, die natürlich jeglicher Grunglage entbehrt. Es gelang ihm nicht, die Citronensäure in kristallisierter Form abzuscheiden. Die wässrige Lösung der Säure gab jedoch alle Reaktionen der Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Willigk (Ann. d. Chem. 82, 343, 1852; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 8, 18, 1852) fällt den wässerigen Auszug von Krappblättern, *Rubia tinctorum*, mit Bleiacetat, um die Gerbstoffe zu entfernen, und dann das Filtrat mit basischem Bleiacetat. Der Niederschlag wurde mit verdünnter Essigsäure digeriert, um die letzten Spuren Gerbsäure zu beseitigen. Das in Essigsäure Unlösliche wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid eingedampft; nach einiger Zeit schieden sich Kristalle ab, die das Aussehen von kristallisierter Citronensäure hatten. Die ganze Masse wurde mit 98proz. Alkohol behandelt, filtriert, das Filtrat mit alkoholischer Bleiacetatlösung gefällt, der Niederschlag mit Alkohol gewaschen und bei 100° getrocknet. Die Analysen stimmten auf $4(C_{12}H_6O_{11}, HO) 9 PbO$.

Der Nachweis ist unzureichend.

Robert Schwarz (Ann. d. Chem. 83, 57, 1852; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 8, 29, 1852) untersuchte das Labkraut, *Galium aparine* und *Galium verum*. Der wässrige Auszug des Krautes wurde mit basischem Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkmilch versetzt und dadurch Gerbsäure, Phosphorsäure und Schwefelsäure ausgefällt. Das Filtrat, in welchem zitronensaurer Kalk enthalten ist, wird durch Schwefelsäure zerlegt und das Filtrat vom Gips eingedampft. Aus dem Sirup scheiden sich nach mehrtägigem Stehen kleine, harte, körnige Kristalle ab, die unter dem Mikroskop denen der Citronensäure gleichen. Die Lösung der Kristalle gab alle Reaktionen der Citronensäure. Der aus der Lösung durch Bleiacetat erhaltene Niederschlag wurde analysiert. Die Analyse stimmt auf eine Doppelverbindung von zitronensaurem und essigsaurem Blei.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Kavalier [Journ. f. prakt. Chem. (1) 60, 321, 1853] unterwarf den weingeistigen Auszug der Nadeln der Kiefer, *Pinus silvestris*, der Destillation, wobei flüchtige Öle übergingen. Der Rückstand war nach Zugabe von Wasser eine trübe Flüssigkeit, die durch einige Tropfen Bleizuckerlösung geklärt und dann filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit Bleiacetatlösung und dann in der Siedehitze mit basischer Bleiacetatlösung gefällt; das Filtrat von den Bleisalzen wurde entbleit und im Kohlendioxidstrom eingedampft. Aus dem Eindampfrückstand konnte der Verfasser auf verwickelte Weise einen Körper erhalten, den er für Citronensäure hält. Die Analyse des Bleisalzes stimmt leidlich auf zitronensaures Blei. Trotz der stimmenden Analyse dürfte nach der ganzen Art der Abscheidung kaum Citronensäure vorgelegen haben.

Der Nachweis ist unzureichend.

Dessaigues (Ann. d. Chem. 80, 120, 1854; C. r. 37, 782, 1852) konzentrierte die aus *Boletus pseudo ignarius* erhaltene rohe Säure (wie, ist nicht angegeben), wodurch Fumarsäure auskristallisierte; das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert und dann mit Chlorkalcium gefällt. Von phosphorsaurem Kalk wurde abfiltriert und das Filtrat erhitzt. Dabei schied sich ein kristallinisches Pulver ab; dieses wurde in schwacher Salpetersäure gelöst und mit Bleiacetat gefällt. Das nicht kristalline Bleisalz wurde wiederholt mit Wasser gekocht. Der in Wasser unlösliche Teil wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt; aus dem eingedampften Filtrat wurden Prismen erhalten, „deren Eigenschaften vollkommen mit Citronensäure übereinstimmen“. Eine Silberbestimmung gab gut auf zitronensaures

Silber stimmende Werte. Eine einzige Silberbestimmung dürfte nicht genügen, um eine Säure sicher zu kennzeichnen.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Schrader (Ann. 121, 370, 1862) untersuchte den bei der Zuckergewinnung aus Rüben, *Beta vulgaris*, in den Eindampfapparaten entstehenden Kalkniederschlag. Dieser wurde in viel kaltem Wasser gelöst, die Lösung mit Bleiacetat gefällt und der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid gab nach dem Eindampfen eine amorphe zähe braune Masse, deren konzentrierte wässerige Lösung auf Zusatz von Alkohol nicht saure Körper abschied. Das Filtrat gab beim Einengen Kristalle, die umkristallisiert die Reaktionen der Citronensäure zeigten. Das bei 130° getrocknete Bleisalz gab lediglich auf zitronensaures Blei stimmende Blei- und Kohlenwasserstoffwerte. Analysen des Bleisalzes sind nicht zureichend, um Citronensäure sicher zu kennzeichnen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Rochleder [Journ. f. prakt. Chem. (1) 98, 205, 1866] fällte den wässerigen Auszug der Rinde der Wurzel des Apfelbaums, *Pirus malus*, mit Bleizucker, verteilte den Bleiniederschlag in Wasser und fügte Essigsäure hinzu, wodurch ein Teil des Niederschlags gelöst wurde. Das Ungelöste wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Bleisulfid im Vakuum bis zur Sirupdicke eingedampft und der Rückstand zur Entfernung von Pektinstoffen mit Alkohol behandelt. Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet, wobei sich Kristalle bildeten. Die Kohlenwasserstoffbestimmung gab Werte, welche auf die Formel $C_{48}H_{30}O_{54}$ stimmten. Diese Formel wird auseinandergezogen zu $C_{12}H_6O_{12}$, 3 $(C_{12}H_6O_{14})$. Die lufttrockene Substanz muß die Zusammensetzung der Citronensäure gehabt haben, da sie beim Trocknen 6,74 % Wasser verlor.

Der Nachweis ist unzureichend.

Gottlieb Stein (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 12, 1603, 1879) preßte *Drosera intermedia* kurz vor der Blütezeit aus, fällte den Preßsaft mit essigsaurem Blei und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde auf dem Wasserbade eingeeengt, der zurückbleibende Sirup kristallisierte nach kurzer Zeit fast vollständig. Das aus der kristallisierenden Säure gewonnene Bleisalz gab gut auf zitronensaures Blei stimmende Bleiwerte.

Der Nachweis ist unzureichend.

K. Andrlík (Zeitschr. f. Zuckerindustr. in Böhmen 24, 645, 1899/1900) kochte den Saturationsschlamm der Zuckerfabrikation, *Beta vulgaris*, mit Sodalösung und verwandelte dadurch die Kalksalze in leicht lösliche Natriumsalze. Nachdem die Lösung der Natriumsalze durch Salzsäure teilweise neutralisiert worden war, wurde mit Essigsäure angesäuert und in der Wärme durch Calciumchlorid die Oxalsäure ausgefällt. Das Filtrat vom Calciumoxalat wurde auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Ammoniak neutralisiert und durch Alkohol die Natronsalze ausgefällt. Die noch kalkhaltigen, gefärbten Salze wurden in mit Essigsäure angesäuertem warmen Wasser gelöst, die Lösung mit Blutkohle entfärbt und durch Ammoniak kieselaurer Kalk ausgefällt. Das Filtrat hiervon wurde gekocht, wobei ein reichlicher Niederschlag von weißer Farbe entstand. Dieser wurde in verdünnter Essigsäure gelöst, mit Ammoniak neutralisiert und gekocht, wobei ein aus mikrokristallinen Nadeln bestehender Nieder-

schlag ausfiel. Das Kalksalz, Kalk- und Wasserbestimmung, gab schlecht auf zitronensauren Kalk stimmende Werte. Verfasser glaubt, daß das Salz noch nicht vollkommen trocken war.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Goupil [Ann. de Chim. et de Phys. (3) 17, 503, 1846] fällte den filtrierten heißen wässerigen Auszug der Tabakblätter, *Nicotiana Tabacum*, mit Bleiacetatlösung und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat wurde nochmals mit Bleiacetatlösung gefällt, wieder mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Verfahren nochmals wiederholt. Aus dem Filtrat vom Bleisulfid „setzten sich nach mehreren Wochen kleine, spitze und harte Kristalle ab“, die umkristallisiert und von beigemengtem Kalk gereinigt wurden. „Diese Kristalle haben das Aussehen von Citronensäure; wenn man sie destilliert, liefern sie Aconitsäure. Das Bleisalz gab eine gut auf zitronensaures Blei stimmende Bleibestimmung.

Das Auftreten von Aconitsäure bei der Destillation der Säure und die gut stimmende Bleibestimmung des Bleisalzes lassen es immerhin als wahrscheinlich erscheinen, daß in den Tabakblättern Citronensäure enthalten ist.

F. Rochleder (Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 56, 140, 1867; Journ. f. prakt. Chem. 102, 103, 1867) fällte den klaren wässerigen Auszug der Stammrinde des Apfelbaums, *Pirus malus*, und der Roßkastanie, *Aesculus Hippocastanum*, mit Bleizucker, verteilte den Bleiniederschlag in wenig Wasser und versetzte mit Essigsäure. Der unlösliche Anteil wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid bis zum Sirup eingedampft. Durch Alkohol wurden dann die Pektinstoffe entfernt. Aus der alkoholischen Lösung wurde weiter die Säure der Apfelbaumstammrinde, welche Citronensäure ist, gewonnen. Sie wurde bei 100° getrocknet und lieferte Kohlenwasserstoffwerte, die gut auf $C_{12}H_8O_{14}$ stimmten. Aus 3,5 kg Rinde wurden 0,5 g Säure erhalten. „Die Stammrinde von *Aesculus Hippocastanum* liefert gleichfalls Citronensäure.“ „Große Rindenmengen muß man in Arbeit nehmen, um nur wenig Material zu einer Analyse zu haben.“

Es dürfte sicher sein, daß in der Stammrinde des Apfelbaums Äpfelsäure enthalten ist: der Nachweis der Citronensäure in der Stammrinde der Roßkastanie ist unzureichend.

C. R. Alder Wright und *G. Patterson* (Journ. Chem. Soc. London 33, 78, 1878) entfernten aus dem Saft unreifer Maulbeeren, *Morus nigra*, die schleimigen Bestandteile durch Behandeln mit Alkohol, verjagten ihn wieder und neutralisierten mit Ammoniak. Auf Zusatz von Calciumchloridlösung entstand in der Kälte kein Niederschlag; nach ½ stündigem Erhitzen fiel ein sandiges Calciumsalz aus. Aus dem Kalksalz wurde durch Zersetzen mit Schwefelsäure die freie Säure erhalten, welche sich als Citronensäure erwies. Aus der Säure wurde nochmals das Kalksalz hergestellt und dieses bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Wasserbestimmung gab keinen guten Wert. Die Kalkbestimmung in dem wasserfreien Salz dagegen einen guten Kalkwert.

Es dürfte vielleicht wahrscheinlich sein, daß in den Maulbeeren Citronensäure enthalten ist.

Fr. Rochleder und *E. Willigk* [Journ. f. prakt. Chem. (1) 56, 72, 1852; Ann. d. Chem. 80, 287, 1851; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 6, 546, 1851] fällten den wässerigen Auszug des Krautes und der Wurzel von *Richardsonia scabra* mit Bleiacetat, kochten den Bleiniederschlag

mit verdünnter Essigsäure aus, filtrierten nach dem Erkalten vom Unlöslichen ab, versetzten das Filtrat mit etwas Ammoniak, wodurch ein gelber Niederschlag entstand, der in Alkohol verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde mit alkoholischer Bleiacetatlösung gefällt, der Niederschlag entbleit und das Filtrat vom Schwefelblei so lange mit Bleiacetatlösung versetzt, als der Niederschlag rein weiß erschien. Das Bleisalz wurde bei 100° getrocknet. Seine Analyse stimmte auf ein kompliziert zusammengesetztes basisches zitronensaures Blei. Aus dem Bleisalz wurde die freie Säure hergestellt, wobei Kristalle erhalten wurden, deren Elementaranalyse gut auf Citronensäure stimmte.

Es dürfte wohl sicher sein, daß im Kraut und in der Wurzel von Richardsonia scabra Citronensäure enthalten ist.

Wittstein (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 6, 192, 1857) dampfte 50 Unzen Blutungssaft der Weinrebe, Vitis vinifera, bei gelinder Wärme ein, filtrierte vom ausgeschiedenen weinsauen Kalk ab und fällte das Filtrat mit Bleiacetatlösung. Der Bleiniederschlag wurde mit Essigsäure behandelt, worin er sich fast vollständig löste. Die klare essigsaure Lösung ließ beim Neutralisieren mit Ammoniak einen weißen Niederschlag fallen, der mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde zunächst auf dem Wasserbade, dann im Exsikkator eingedunstet, „wo zuletzt eine weiße kristallinische luftbeständige Rinde von stark unangenehmem saurem Geschmack hinterblieb, die mit Kali keine Reaktion auf Weinsäure gab“. Aus der Säure wurde das Silbersalz hergestellt, dessen Elementaranalyse gut auf zitronensaures Silber stimmte.

Es dürfte wohl sicher sein, daß im Blutungssaft der Weinreben Citronensäure enthalten ist.

F. Rochleder (Journ. f. prakt. Chem. 107, 385, 1869; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 59, 819, 1869) fällte den wässerigen Auszug der Blätter der Sauerkirsche, Prunus cerasus, Cerasus acidula, mit Bleiacetatlösung, zerlegte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und versetzte das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkwasser im Überschuß. Das Filtrat vom Kalkniederschlag wurde mit Essigsäure schwach angesäuert, mit Bleiacetatlösung gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Bleisulfid zum Sirup eingeeengt. Nach mehrstäglichem Stehen kristallisierte Citronensäure aus. Die Elementaranalyse gab gut auf Citronensäure stimmende Werte.

Auch in der Rinde des Sauerkirschenbaums soll Citronensäure vorhanden sein; der Nachweis ist jedoch unzureichend. *Es dürfte sicher sein, daß in den Blättern der Sauerkirsche Citronensäure vorhanden ist.*

Ad. Beyer [Arch. d. Pharm. (2) 151, (3) 1 (ganze Serie 201), 40, 1872; Landw. Versuchsstat. 14, 1871] untersuchte Lupinensamen. „Die wässrige Lösung des alkoholischen Lupinenextrakts, aus welchem das noch zu beschreibende wachsartige Fett abgeschieden war, wurde direkt mit essigsaurem Bleioxyd gefällt. Nach mehrfachem Auswaschen wurde der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Es resultierte nach Entfernen des Schwefelbleies und Eindampfen eine stark saure Flüssigkeit. Barytwasser erzeugte in derselben einen zuerst verschwindenden, dann aber bleibenden kristallinischen Niederschlag. Durch fraktionierte Fällung wurde dieses Barytsalz vollkommen frei von Phosphorsäure erhalten. Um dies zu erreichen, muß die Flüssigkeit bis zuletzt stark sauer sein. Die Mutterlauge

G. Campani und *S. Grimaldi* (*Gaz. chim. ital.* 18, 441, 1888) extrahierten den Samen der weißen Lupine, *Lupinus albus*, mit Wasser, entfernten Protein- und Pektinstoffe und untersuchten nun nach der von *Post* (*Traité complet d'analyse chimique*) angegebenen Methode. Aus dem gewonnenen Calciumcitrat wurde die Citronensäure in schönen Kristallen erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (*Pharm. Rundsch. New York* 8, 59, 1890) fällte den wässrigen Blätterauszug von *Cephalanthus occidentalis* mit Bleiacetat, kochte die Bleisalze mit Alkohol aus und zersetzte dann mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Man erhält so schon eine ziemlich gereinigte Säure, aus deren wässriger Lösung, wenn man mit etwas Chlorammon und einem Überschuß von Chlorcalcium und Ammoniak längere Zeit kocht, ein reichlicher Niederschlag von Calciumcitrat sich absetzt.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (*Pharm. Rundsch. New York* 8, 107, 1890) rührte zerquetschte Cranbeeren mit heißem Wasser an, versetzte mit einem geringen Überschuß von Kalkmilch und fügte dann einen geringen Überschuß von Salzsäure hinzu. Dann wurde abfiltriert, ausgewaschen und das Filtrat unter gelindem Erwärmen mit überschüssigem Ammoniak versetzt; die abgeschiedenen Flocken wurden abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand unter Zusatz von Ammoniak mit siedendem Wasser übergossen. Das nicht gelöste Calciumcitrat wurde abfiltriert und mit heißem Wasser gewaschen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Ölze (*Sitzungsber. d. physik.-med. Soc. in Erlangen*, Heft 22, S. 17, 1890) zog Frucht und Blätter der Preiselbeeren, *Vaccinium vitis idaea*, mit Wasser aus, fällte den wässrigen Auszug mit Bleiacetat und schüttelte das Filtrat vom Bleisulfid mit Äther aus. Der nach dem Abdestillieren des Äthers verbleibende Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, mit Natriumcarbonat neutralisiert, Kalkwasser und ein Überschuß von Calciumchlorid hinzugesetzt. Hierbei entstand ein Niederschlag, weswegen auf Weinsäure geschlossen wurde; das Filtrat vom weinsauren Kalk gab beim Kochen einen weiteren Niederschlag, weswegen auf Citronensäure geschlossen wurde.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (*Pharm. Rundsch. New York* 8, 262, 1890) untersuchte in der gleichen Weise wie *Cephalanthus occidentalis* auch *Rhus aromatica* und fand angeblich Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Belzung (*Journ. de Botanique* 5, 25, 1891) ließ junge Pflanzenteile der weißen Lupine, *Lupinus albus*, sich in einer Lösung von Calciumcitrat oder Calciumacetat (1 bis 3 g im Liter) entwickeln; unter den innegehaltenen Bedingungen vollzog sich die Keimung innerhalb mehrerer Wochen. „Betrachtet man die Zellen der Lupinen nach einigen Tagen Einfluß von Calciumnitrat unter dem Mikroskop, so überwuchern nach einigen Minuten zahlreiche kugelförmige Kristallhaufen, gebildet von kurzen Nadeln, mehr oder weniger gepreßt, ebenso häufig isolierte Nadeln oder Büschel die ganze schwammartige Zellsubstanz. Vergleiche mit dargestelltem Calciumcitrat ergaben Übereinstimmung.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Wilhelm Keim (Zeitschr. f. analyt. Chem. **30**, 401, 1891) versetzte den Saft der Sauerkirschen, *Prunus cerasus*, mit frisch gefälltem kohlen-sauren Kalk in nicht zu großem Überschuß, engte stark ein und fällte die Kalksalze durch Alkohol. Diese wurden dann mit kohlensaurem Natron gekocht und dadurch in eine Lösung der Natronsalze umgewandelt. „Die durch Essigsäure neutralisierte Lösung wurde, um Äpfelsäure und Bernstein-säure in Lösung zu halten, mit Ammoniumacetat versetzt und darauf mit Calciumacetat bei Siedehitze behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und unter Zuhilfenahme von Essigsäure gelöst, mit Blei-acetat gefällt, filtriert, gewaschen, in Wasser suspendiert und durch Schwefel-wasserstoff zerlegt. Das Filtrat wurde verdunstet, mit 90proz. Alkohol ausgezogen und die Lösung abermals zur Trockne gebracht. Mit der auf diese Weise isolierten Citronensäure konnten die charakteristischen Reak-tionen ausgeführt werden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Salomon Frankfurt (Landw. Versuchsstat. **43**, 149, 1894) fällte den wässerigen Auszug ungekeimter Hanfsamen, *Canabis sativa*, mit Blei-acetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, fällte noch zweimal mit Bleiessig und zerlegte den Bleiniederschlag wieder; das Filtrat wurde „konzentriert mit Kalkwasser gesättigt und eine Zeitlang gekocht; es schied sich ein kristallinisches Kalksalz aus, das in Chlorammonium-lösung löslich war. Die Reaktion beweist das Vorhandensein von Citronen-säure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Nacken (Forschungsberichte über Lebensmittel und ihre Beziehungen zur Hygiene, über forense Chemie und Pharmakognosie, **2**, 358, München, 1895) fällte 4 Liter Heidelbeersaft, *Vaccinium myrtillus*, mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und entfernte aus dem Filtrat vom Bleisulfid durch Kochen mit Tierkohle den Farb- und den Gerbstoff. „Zur Trennung der einzelnen Säuren wurde das Verhalten ihrer Kalksalze benutzt. Ein Zusatz von Chlorkalciumlösung und Kalkwasser zum farblosen Filtrat rief keinen Niederschlag hervor, wodurch die Abwesenheit von Oxalsäure und Weinsäure nachgewiesen war. Eine alko-holische Kaliumacetatlösung gab ebenfalls auch nach längerem Kochen keine Fällung. Zur Abscheidung von Citronensäure wurde zum Sieden erhitzt, wobei sich eine reichliche Fällung zeigte, die auf dem Filter mit siedend heißem Wasser ausgewaschen wurde. Nach dem Eindampfen des Filtrats auf wenige Kubikzentimeter trat die Ausscheidung von äpfel-saurem Kalk ein, die durch Alkoholzusatz vervollständigt wurde.“

„Zur Identifizierung wurden die Niederschläge wie folgt weiter be-handelt: Die erste Fällung, die zu einem kleinen Teil aus kohlensaurem Kalk bestand, wurde mit kaltem Wasser ausgelaugt, die Lösung mit Essig-säure schwach angesäuert und mit Bleiacetat gefällt. Durch Zersetzung der ausgewaschenen Bleifällung mit Schwefelwasserstoff wurde eine reine Citronensäurelösung erhalten, die auf dem Wasserbade zur Kristallisation eingedampft wurde. Die erhaltenen Kristalle wurden als Citronensäure durch den Schmelzpunkt und das charakteristische Verhalten ihres Bariumsalzes erkannt. Selbst nach wochenlangem Stehen blieb das Barium-salz amorph; dagegen zeigte dasselbe ein kristallinisches Gefüge, wenn es sich aus einer schwach mit Essigsäure angesäuerten Lösung abschied; unter dem Mikroskop betrachtet, in Gestalt kleiner, teils zu dichten Büscheln vereinigter Nadelchen.“

Lebreton (Journ. de Pharm. 14, 383, 1828) zog Pomeranzen, *Citrus Bigaradia*, mit Alkohol aus, dampfte den Auszug ein, behandelte den Rückstand mit Äther, löste in Wasser und fällte mit Bleiacetat. Das Filtrat vom zersetzten Bleiniederschlag wurde bei 20 bis 25° verdunstet; bei längerem Stehen schieden sich Kristalle ab, die durch Umkristallisieren gereinigt wurden. „Die Lösung rötete Lackmus, gab mit Kalkwasser ein unlösliches Salz, aber zerlegte keine Kalksalze; bei teilweiser Neutralisation mit Ätzkali entstand kein Niederschlag; alle die Merkmale lassen auf Citronensäure schließen.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Justus Liebig (Ann. de Pharm. 5, 141, 1833) versetzte den Saft der Vogelbeeren, *Pirus aucuparia*, mit kohlen saurem Kalk bis zur beinahe neutralen Reaktion, fällt mit Bleinitrat und kocht den Bleiniederschlag so lange mit verdünnter Schwefelsäure, bis er seine körnige Beschaffenheit verloren hat. Zu der breiartigen Masse wird Schwefelbarium so lange zugesetzt, bis Barium im Überschuß vorhanden ist, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelbarium und zuletzt mit Bariumcarbonat vollständig gesättigt und erhitzt. Beim Neutralisieren bildet sich stets ein großer körniger Niederschlag von weinsaurem und zitronensaurem Baryt, von welchem abfiltriert wird.

Der Nachweis ist unzureichend.

L. F. Bley [Journ. f. prakt. Chem. (1) 6, 294, 310, 1835] fällte den wässrigen Auszug der Aprikosen, *Prunus armeniaca*, mit Bleiacetatlösung, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, engte das Filtrat vom Bleisulfid ein und entfernte durch Behandeln mit Alkohol Gummistoffe. Die alkoholische Lösung lieferte beim Eindunsten eine gelbbraune, sirupartige Flüssigkeit, die bei längerem Stehen an warmer Luft kristallinische Ansätze zeigte. *Bley* hält die Kristalle für unreine Citronensäure, gemischt mit Spuren Äpfelsäure. Über die Trennung der beiden Säuren ist nichts angegeben. Die Äpfelsäure wird durch die Reaktion mit schwefelsaurem Kupferoxydammoniak, wobei ein apfelgrüner Niederschlag entsteht, gekennzeichnet. Die Citronensäure wird in folgender Weise nachgewiesen: „In Wasser zeigte sich diese Säure leicht löslich, schwieriger in Alkohol. Die Lösung in Wasser verhielt sich gegen Reagenzien also: Lackmus stark gerötet; Bleizucker starken weißen Niederschlag; Kalkwasser Niederschlag, in Salpetersäure löslich; Kalilösung gab nach der Sättigung eine braune hygroskopische Salzmasse; kohlen saures Natron gab ein braunes Salz, welches ebenfalls ein wenig Feuchtigkeit zeigte.“

Der Nachweis ist unzureichend.

L. F. Bley [Arch. d. Pharm. d. Apothekerver. im nördlichen Teutschland, ganze Reihe 68 (zweite Reihe 18), 251, 1838] dickte den Saft völlig reifer Himbeeren, *Rubus idaeus*, ein, entfärbte mit Tierkohle und sättigte mit Kreide. Aus dem Niederschlag wurde durch Behandeln mit heißem Wasser äpfelsaurer Kalk herausgelöst und das unlösliche Kalksalz mit Schwefelsäure zersetzt. Das Filtrat vom Gips schied nach dem Eindampfen „schwach gelblich gefärbte Kristalle von sehr saurem Geschmack, die in freier Flamme schmolzen, aufblähten, unter anfangs zuckerähnlichem, hernach stechendem Geruch verkohlten. In Wasser lösten sich die Kristalle leicht. Die Auflösung gab, mit kohlen saurer Kalkerde versetzt, ein kristallinisches Salz.“ „Salzsaure Kalklösung gab weder Trübung noch Kristallsalz. Essigsaures Blei bewirkte einen Niederschlag, salpetersaures nicht.

Goldlösung ward schnell reduziert. Die Säure ist für Citronensäure zu halten. Das Mengenverhältnis zu Äpfelsäure wie 8 : 13.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Fr. Michaelis [Arch. d. Pharm. d. Apothekerver. im nördlichen Teutschland (2) 18, 236, 1838] preßte Kartoffeln, *Solanum tuberosum*, aus, verdunstete den Saft, nahm den Rückstand mit Wasser auf, filtrierte aus und fällte das Filtrat mit Bleiacetatlösung. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid eingedampft und durch Behandeln mit Alkohol Gummistoffe entfernt. „In der davon getrennten Flüssigkeit zeigte sich mir Citronensäure, aber keine Spur Weinsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Walz [Jahrb. f. prakt. Pharm. 7 (oder neue Folge 4), 285, 1843; 8 (oder neue Folge 5), 149, 1844] extrahierte die gröblich gepulverte Wurzel von *Escholtzia californica* mit durch Essigsäure angesäuertem Wasser, fällte dann mit Ammoniak und weiterhin mit Bleiacetatlösung. Aus dem Bleiniederschlag wurden Barytsalze hergestellt und diese mit Weingeist ausgezogen. Der in Weingeist unlösliche Anteil von den Barytsalzen wurde mit heißem Wasser ausgezogen; es fand sich in der Lösung: Salzsäure, Citronensäure, Äpfelsäure ...“

Der Nachweis ist unzureichend.

Walz [Jahrb. f. prakt. Pharm. 5 (oder neue Folge 2), 284, 1842] behandelte den eingedickten wässrigen Auszug der Wurzeln der Einbeere, *Paris quadrifolia*, mit Alkohol in der Wärme, filtrierte vom Unlöslichen ab, verdampfte den Alkohol und nahm den Rückstand mit Wasser auf. „Es entstand durch Bleizucker ein bleibender Niederschlag; nach der Zersetzung mit Hydrothionsäure enthielt er Citronensäure, Äpfelsäure usw.“

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Riegel [Arch. d. Pharm., zweite Reihe 55 (ganze Reihe 105), 151, 1848] fällte den Saft reifer Beeren von *Vitis sylvestris* mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und versetzte das Filtrat vom Bleisulfid mit Ätzbaryt. Der Barytniederschlag bestand „aus weinsauerm, äpfelsauerm und einer geringen Menge zitronensaurem Baryt. Die von diesen Salzen abfiltrirte Flüssigkeit wurde zur Trockne verdunstet und mit Äther digeriert, der nur Spuren von Chlorophyll daraus aufnahm; Alkohol entzog ihm eine geringe Menge Farbstoff. Der in Äther und Alkohol unlösliche Teil der Salzmasse bestand aus weinsauerm, äpfelsauerm und zitronensaurem Baryt.“

S. 154. „Die Ähnlichkeit der reifen Beeren der *Vitis sylvestris* mit den reifen Beeren von *Sambucus ebulus* und *nigra* und *Vaccinium myrtillus* veranlaßte noch eine vergleichende Untersuchung..., die übrigen Bestandteile der Beeren von *Sambucus ebulus* und *nigra* sind... hauptsächlich Äpfelsäure mit Spuren Citronensäure.... Die Heidelbeeren enthalten Äpfel- und Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Riegel [Arch. d. Pharm., zweite Reihe 61 (der ganzen Reihe 111), 161, 1850] zerstieß 2 Pfund reife Beeren der Myrte, *Myrtus communis*, und unterwarf sie der Wasserdampfdestillation, bis keine Öltröpfchen mehr übergingen. „Der Rückstand von der Destillation wurde filtriert, im Wasserbade verdampft, hierauf mit Alkohol bei gelinder Wärme bis zur völligen Erschöpfung behandelt. Nach Entfernung des größten Theiles des Alkohols durch Destillation wurde der Rückstand im Wasserbade

verdampft und das zurückgebliebene Extrakt a) mit Äther ausgezogen (ölharziger Rückstand), b) mit Alkohol ausgezogen (Zucker, Extraktivstoffe), c) der in Äther und Alkohol unlösliche Rückstand des ursprünglichen wässerigen Extrakts ward in Wasser gelöst.“ Der mit Schwefelwasserstoff zerlegte Bleiniederschlag wurde „mit Ammoniak neutralisiert, dann mit einer Auflösung von Chlorbarium und salpetersaurem Silber versetzt, wodurch in beiden Fällen ein weißer, in Salpetersäure löslicher Niederschlag entstand. Chlorcalcium bewirkte bei gewöhnlicher Temperatur keinen Niederschlag, wohl aber beim Kochen einen weißen, in Kali unlöslichen, in Ammoniaksalzen und freier Säure löslichen Niederschlag-Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

H. Braconot [Journ. f. prakt. Chem. (1) 89, 134, 1850] extrahierte 100 g Eicheln, *Quercus pedunculata*, *Quercus sessiliflora*, mit Wasser, filtrierte und dampfte das Filtrat bis zur Honigkonsistenz ein. Nach einem Jahre hatten sich „harte sandähnliche Körner und ein fein zerteiltes erdiges Salz“ abgeschieden. Die Abscheidung wurde mit Alkohol gewaschen und dann mit siedendem Wasser behandelt, wobei das erdige Salz ungelöst zurückblieb, welches abfiltriert wurde. 0,1 g. Bei der Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure entstand schwefelsaurer Kalk; das Filtrat von diesem kristallisierte nach dem Eindampfen mit großer Schwierigkeit. „Die wässerige Lösung wurde durch salpetersaures Bleioxyd nicht getrübt. Mit essigsäurem Bleioxyd entstand ein reichlicher weißer Niederschlag, der sich nicht in Essigsäure, wohl aber in verdünnter Salpetersäure auflöste. In kleiner Menge in Barytwasser gegossen, entstand ein weißer voluminöser Niederschlag, der durch Salpetersäure wieder verschwand. Kalkwasser wird im Augenblick des Zusammengießens nicht getrübt, erst nach 2 Stunden hat sich ein geringer Niederschlag gebildet. Nach den angegebenen Eigenschaften scheint die fragliche Säure Citronensäure zu sein.“

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Willigk [Ber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 9, 302, 1852; Journ. f. prakt. Chem. (1) 58, 205, 1852; Ann. d. Chem. 84, 363, 1852] untersuchte die Blätter des Sumpfporstes, *Ledum palustre*. „Das braunrote Dekokt gibt auf Zusatz von Bleizucker einen in Essigsäure beinahe unlöslichen Niederschlag von schmutzig-brauner Farbe, später entsteht ein gelber, in verdünnter Essigsäure leicht löslicher Niederschlag.“ Gerbsäure. Der erste Niederschlag wurde entbleit, das Filtrat mit Tierkohle behandelt und die gereinigte Lösung verdunstet. „Aus der konzentrierten Lösung kristallisierte nach mehrere Monate langem Stehen die Citronensäure in großen regelmäßigen Kristallen aus.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Justus Wolff (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 8, 1, 1854) zerlegte den aus dem wässerigen Auszug des Birkenschwamms, *Boletus scaba*, erhaltenen Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, dampfte das Filtrat vom Schwefelblei zur Sirupdicke ein und nahm den Rückstand mit Wasser auf. „Die Lösung gab mit Kalkwasser einen in Salmiak löslichen Niederschlag; das Filtrat trübte sich beim Erhitzen. Mit Bariumchlorid entstand in dieser Lösung kein Niederschlag; ebenso keiner beim Erwärmen mit molybdänsaurem Ammon und Salpetersäure.“ „Demnach bestanden die von Riegel (Jahrb. f. prakt. Pharm. 12, 168) gefundene Schwammsäure und Boletsäure aus Weinsäure, Citronensäure und Äpfelsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

H. Hlasiwetz [Journ. f. prakt. Chem. (1) **65**, 445, 1855; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. **15**, 165, 1855] fällte die Abkochung der Wurzel des Hauhechels, *Ononis spinosa*, mit Bleizucker, zerlegte mit Schwefelwasserstoff und dampfte das Filtrat vom Bleisulfid langsam zur Sirupdicke ein. Nach langem Stehen setzten sich kleine geschmacklose Kristalle ab; sie wurden abfiltriert, mit Wasser gewaschen, in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure zersetzt; das Filtrat vom Gips gab nach wochenlangem Stehen harte, stark saure Kristalle, die alle Eigenschaften der Citronensäure besaßen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Vielluth (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **5**, 193, 1856) trocknete ganze Pflanzen von *Galium mollugo*, jedoch ohne Wurzel und extrahierte die gröblich gepulverten Pflanzen zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und kochte schließlich mit Wasser aus. Der wässerige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid „mit Kalkwasser versetzt und gekocht; es entstand kaum eine leise Trübung, Spuren von Citronensäure anzeigend“. Das Filtrat vom Bleiniederschlag gab mit Ammoniak einen zitronengelben Niederschlag, der abfiltriert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. „Ein Teil dieses Filtrats schüttelte man mit Kalkwasser. In der Kälte entstand dadurch keine Trübung, wohl aber, als die Mischung erhitzt wurde. Es war folglich Citronensäure vorhanden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

J. Lefort [Journ. de Pharm. et de Chim. (3) **29**, 198, 1856] entfärbte den geklärten Saft von *Agaricus campestris* mit Tierkohle, dampfte bis zur Kristallisation ein und filtrierte das Gemisch von Mannit und Fumarsäure ab. Die Mutterlauge wurde mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid eingedampft, um die letzten Anteile Fumarsäure zu entfernen. Das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert, mit Calciumchloridlösung versetzt und dadurch Calciumsulfat und Calciumphosphat ausgefällt. Das Filtrat hiervon trübte sich beim Erhitzen unter Bildung von unlöslichem Calciumcitrat.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. Lefort [Journ. de Pharm. et de Chim. (3) **31**, 445, 1857] engte den wässerigen Auszug von 1 kg vollkommen trockener Trüffeln auf etwa 250 ccm ein, fällte mit schwach basischem Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und engte das Filtrat vom Bleisulfid bis zur Sirupdicke ein; Fumarsäure schied sich nicht aus. Die Flüssigkeit wurde mit Ammoniak neutralisiert und durch Calciumchloridlösung Phosphorsäure und Schwefelsäure ausgefällt. Das Filtrat von der Fällung gab beim Kochen eine Trübung von Calciumcitrat; in dem Filtrat hiervon konnte Äpfelsäure nachgewiesen werden.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. B. Enz (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. **7**, 182, 1858) extrahierte das Blattpulver des Ehrenpreis, *Veronica officinalis*, zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und schließlich mit heißem Wasser. Die wässerige Lösung gab mit Eisenchlorid eine grünliche Färbung, mit Jodlösung und Gipslösung keine Veränderung, während Alkohol einen flockigen Niederschlag erzeugte. „Außerdem bestätigten die Vorreaktionen das spurenweise Vorhandensein folgender Säuren: Citronensäure, Äpfelsäure, Weinsäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Michaelis [Journ. f. prakt. Chem. (1) 46, 467, 1859] fällte Rübensaft, *Beta vulgaris*, zur Entfernung von Pektinstoffen mit Alkohol und machte mit Ammoniak alkalisch. Mit essigsaurem Magnesium wurde zunächst die Phosphorsäure und dann mit essigsaurem Kalk die Oxalsäure abgeschieden; das ammoniakalische Filtrat wurde eingedampft, bis es neutral reagierte, dann mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Bleizucker gefällt. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid eingengt und mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb „rein weiße, kristallisierte Citronensäure zurück“.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. Leube jun. (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 9, 321, 1860) extrahierte 50 g fein gepulverte Kamala, *Rottlera tinctoria*, zunächst mit Äther und kochte dann mit Wasser aus. Der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid . . . „mit Kalkwasser gab er kalt keinen, beim Kochen aber einen flockigen Niederschlag, der sich in der Kälte wieder löste“. Im Filtrat vom Bleiniederschlag erzeugte Ammoniak einen Niederschlag; dieser mit Schwefelwasserstoff zerlegte Niederschlag „gab aber ebenfalls mit Kalkwasser erst beim Kochen einen und beim Abkühlen wieder verschwindenden Niederschlag“. „Diese Reaktionen lassen auf Anwesenheit von Citronensäure und . . . schließen.“

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Lindau (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 10, 406, 1861) unterwarf 1,5 Pfund Rinde von *Cedrela Febrifuga* der Wasserdampfdestillation, filtrierte den Destillationsrückstand und fällte die wässrige Lösung mit Bleiacetat. Das Filtrat vom Bleiniederschlag gab, mit Ammoniak neutralisiert, einen Niederschlag, der mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Schwefelblei wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und von abgeschiedenen erdfarbenen Massen abfiltriert. In dem sauren Filtrat wurde durch Kalkwasser ein Niederschlag hervorgerufen, der abfiltriert wurde. „Brachte man das Filtrat zum Kochen, wodurch abermals eine starke Trübung entstand, die indessen beim Erkalten vollständig verschwand (Citronensäure).“

Der Nachweis ist unzureichend.

Fr. Schnitzer (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 11, 1, 1862) extrahierte Lopezwurzeln mit Wasser, zerlegte den Bleiacetatniederschlag mit Schwefelwasserstoff und filtrierte vom Bleisulfid ab. In dem Filtrat erzeugte Chlorbarium eine schwache Trübung. „Kalkwasser bewirkte darin einen flockigen Niederschlag, von dem man schnell abfiltrierte. In dem Filtrat wurde durch Erwärmen aufs neue ein flockiger Niederschlag erzeugt, der beim Erkalten wieder verschwand, mithin die Gegenwart von Citronensäure andeutete.“ Das Filtrat vom Bleiniederschlag wurde mit Ammoniak gefällt und der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem eingengten Filtrat vom Schwefelblei schied sich nichts aus. „Eisenchlorid und Kalkwasser zeigten auch hier die Gegenwart von Gerbstoff und Citronensäure an.“

Der Nachweis ist unzureichend.

J. Hanamann (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 12, 517, 1863) extrahierte den gröblich gepulverten Samen von *Phalaris canariensis* zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und schließlich mit Wasser. Der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt und das Filtrat vom Bleiniederschlag mit Ammoniak neutralisiert; der so erhaltene Niederschlag

wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei „mit Kalk behandelt, welches dadurch klar blieb, sich aber beim Erwärmen trübte und beim Erkalten wieder klärte. Dieses Verhalten deutet auf die Anwesenheit von Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Fr. M. Braude und V. v. Rakowiecki (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 13, 33, 1864) extrahierte Bucheckern, *Fagus sylvatica*, zunächst mit Äther, dann mit warmem Alkohol und zuletzt mit kaltem Wasser. Der wässrige Extrakt wurde eingedampft und durch Behandeln des Rückstandes mit Alkohol Pektinstoffe entfernt. Die alkoholische Lösung wurde von Alkohol befreit und die wässrige Lösung mit Bleiacetat gefällt. Der Bleiniederschlag wurde mit Essigsäure behandelt, worin er sich zum Teil löste, das Filtrat mit Ammoniak versetzt und der hellgelbe Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid gab „mit Kalkwasser durch die erst beim Erwärmen eingetretene Trübung, welche in der Kälte wieder verschwand, die Gegenwart von Citronensäure zu erkennen“.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Dieterich (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 15, 201, 1866) extrahierte zerkleinerte Edelkastanien, *Castanea vesca*, zunächst mit Äther, dann mit Alkohol und weiterhin mit kaltem Wasser; der wässrige Auszug wurde mit Bleiacetat gefällt und im Filtrat vom Bleiniederschlag durch Sättigen mit Ätznatron ein weiterer Bleiniederschlag erzeugt. Dieser wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt; im Filtrat vom Bleisulfid fanden sich Spuren von eisengrünender Gerbsäure, auch noch Citronensäure, „denn mit Kalkwasser übersättigt, entstand beim Kochen eine Trübung, die beim Erkalten wieder verschwand“.

Der Nachweis ist unzureichend.

V. Leutner (Pharm. Zeitschr. f. Rußland 10, 687, 1871) digerierte mit Alkohol und Äther erschöpfte Vanille, *Vanilla planifolia*, mit Wasser und fällte den wässrigen Auszug mit Bleiacetat. Der Bleiniederschlag wurde dann durch Auskochen mit Wasser von äpfelsaurem Blei befreit. Der in Wasser unlösliche Teil des Bleiniederschlags wurde mit Essigsäure digeriert und filtriert; aus dem essigsäuren Filtrat wurden durch Ammoniak die Bleisalze wieder ausgefällt und nach dem Abfiltrieren in alkoholischer Suspension mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde eingedampft; in dieser Flüssigkeit brachte Chlorcalcium und Kalkwasser einen Niederschlag hervor, welcher sich in Chlorammonium wieder löste; die von diesem Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit gab beim Erhitzen eine Trübung.

Der Nachweis ist unzureichend.

Gräber (Neues Jahrb. f. Pharm. 36, 209, 1871) untersuchte die Säuren der Preiselbeeren, *Vaccinium vitis idaea*; über ihren Nachweis findet sich nur: „Was die Natur der freien Säure anbelangt, so ist sie in der Hauptsache als Citronensäure anzunehmen. Hierfür spricht nicht nur das Verhalten des Kalksalzes, von welchem als charakteristisch angegeben wird, daß es beim Kochen seiner wässrigen Lösung sich ausscheidet, wie ich es auch bei dem durch reinen kohlensauren Kalk neutralisierten Saft gefunden habe. Andererseits spricht für Citronensäure auch die Kristallform, aus der durch Schwefelwasserstoff aus dem Bleisalz abgeschiedenen Säure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Thomas D. McElhenie (Amer. Journ. of Pharm. 44, 198, 1872) versetzte eine Gallone des Saftes reifer Tomaten, *Solanum Lycopersicum*, in heißem Zustande so lange mit Calciumcarbonat, bis die Gasentwicklung aufhörte. Die Kalksalze wurden mit Schwefelsäure zersetzt und das Filtrat vom Gips eingedampft. Die nach mehrwöchigem Stehen abgeschiedene kristalline Masse, die durch braunen Extraktivstoff verunreinigt war, wurde nach dem Gang von *Wills* Tabellen untersucht und Citronensäure, Äpfelsäure und Oxalsäure gefunden. Um die Säuren zu trennen, wurde die Masse mit Wasser aufgenommen, die Lösung mit Kalkwasser neutralisiert und gekocht, bis Calciumcitrat ausfiel. Dieses wurde mit Schwefelsäure zerlegt, das Filtrat vom Calciumsulfat eingedampft und sich selbst überlassen. Es schieden sich Kristalle ab, die aber mit einer farbigen zähen Masse verunreinigt waren.

Der Nachweis ist unzureichend.

Gräger (Neues Jahrb. f. Pharm. 39, 193, 1873) gibt im Anschluß an seine frühere Arbeit eine Methode zur Darstellung von Citronensäure aus Preiselbeeren. Die Beeren werden ausgepreßt, der Saft mit Leim geklärt, mit Kalk neutralisiert und gekocht, bis aller zitronensaurer Kalk ausgefällt ist; das Kalksalz wird aus Wasser umkristallisiert und durch Schwefelsäure die Citronensäure in Freiheit gesetzt. Er fand, daß die Säure der Preiselbeeren nicht aus reiner Citronensäure, sondern zu einem Viertel bis einem Drittel aus Äpfelsäure besteht; die Beeren scheinen um so mehr Citronensäure zu enthalten, je reifer sie sind. Aber auch in den völlig reifen Beeren fehlt die Äpfelsäure nicht ganz.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Schulze (Landw. Jahrb. 5, 840, 1876) fällte den wässerigen Extrakt der Lupinen mit Bleiacetat und behandelte den Bleiniederschlag zur Extraktion des zitronensauren Bleies mit Ammoniak, wobei der größte Teil des Niederschlags sich auflöste. „Die aus dieser Lösung durch angemessene Behandlung abgeschiedene freie Säure gab die charakteristischen Reaktionen der Citronensäure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

v. Dragendorff (Arch. d. Pharm. 212, 121, 1878) extrahierte *Ubyaea Schimperii* mit Wasser, fällte mit Bleiacetat und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Im Filtrat vom Bleisulfid wurde durch Kalkwasser beim Erwärmen ein Niederschlag erzeugt und deshalb auf Citronensäure geschlossen.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. O. v. Lippmann (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 12, 1649, 1879) gewann aus den Kalkniederschlägen der Zuckerfabrikation durch Zerlegen mit Schwefelsäure, Aufnehmen mit Alkohol und Fällen mit Äther Citronensäure. Nähere Kennzeichnung fehlt.

Der Nachweis ist unzureichend.

H. van Allen (Amer. Journ. of Pharm. 52, 441, 1880) extrahierte drei Unzen Rinde von *Viburnum prunifolium* zunächst mit Äther und perkolierte dann mit Wasser. Das saure Perkolat gab mit Kalkwasser einen Niederschlag (Oxalsäure); das Filtrat gab beim Kochen einen zweiten Niederschlag, der abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen wurde; er löste sich klar in Ammoniak; beim Kochen der Lösung wurde ein Niederschlag von zitronensaurem Kalk erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

George A. Ferdinand [Amer. Journ. of Pharm. **52**, 295, 1880; Justs Botan. Jahresber. **8** (1), 385, 1880] kochte Kranbeerensaft, *Vaccinium macrocarpum*, und neutralisierte durch Zusatz von Calciumcarbonat und Kalkmilch; der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit kochendem Wasser gewaschen und getrocknet. In der wässerigen Lösung des Niederschlags entstand auf Zusatz von Calciumchloridlösung beim Kochen ein weißer Niederschlag. Silbernitratlösung gab einen farblosen Niederschlag, der sich erst nach längerem Kochen schwärzte. Auf Zusatz von Permanganat trat beim Kochen keine Reduktion ein. Auf Zusatz von Calciumhydroxylösung trat in der Kälte keine Reduktion ein, beim Kochen bildete sich jedoch ein weißer Niederschlag. Aus diesen Reaktionen wird auf die Gegenwart von Citronensäure geschlossen.

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Grüning (Arch. d. Pharm. **220**, 594, 1882) extrahierte je 200 g der Rhizome der weißen und gelben Teichrose, *Nymphaea alba* und *luteum*, mit Wasser, fällte zunächst die Gerbsäure durch Kupferacetat aus, entkupferte durch Schwefelwasserstoff und fällte dann mit Bleiacetat. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Natronlauge neutralisiert und mit Chlorcalcium und Kalkwasser versetzt. Der verhältnismäßig große Niederschlag enthielt die Kalksalze der Weinsäure und Oxalsäure. „Das Filtrat vom Kalkniederschlag schied beim Erhitzen zitronensauren Kalk ab; die davon abfiltrierte Lösung wurde mit Alkohol fraktioniert gefällt; zuerst fiel Calciumcitrat, dann äpfelsaurer Kalk aus.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Nessler und *Barth* (Zeitschr. f. analyt. Chem. **21**, 63, 1882) dampften 100 ccm Wein, *Vitis vinifera*, ein, behandelten den Rückstand mit Alkohol, verdampften letzteren und lösten den Rückstand in Wasser zu 20 ccm. Die Lösung wurde mit Kalkmilch abgestumpft, filtriert, das Filtrat auf 100 ccm gebracht, mit 0,5 bis 1 ccm Bleiacetatlösung gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit dünner Kalkmilch alkalisch gemacht, um die Phosphorsäure abzuscheiden, das Filtrat mit wenig Essigsäure angesäuert und $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde stehen gelassen, um eventuell vorhandene Weinsäure als weinsäuren Kalk abzuscheiden. Das Filtrat wurde zur Trockne eingedampft, mit heißem Wasser aufgenommen und konzentriert, bis zitronensaurer Kalk ausfiel. „Nach dieser Methode kann man 20 mg zugesetzte Citronensäure zu 100 ccm Wein deutlich nachweisen; wir erhielten einen Niederschlag, der 13 mg Citronensäure entsprach.“ Zum sicheren Nachweis der Citronensäure dürfte die Methode ungeeignet sein.

Der Nachweis ist unzureichend.

Kossowitsch (Journ. d. russ. physik.-chem. Ges. **19**, 272, 1887) versetzte Moosbeerensaft, *Vaccinium oxycoccos*, mit Kaliumchloridlösung; ein Niederschlag entstand nicht; Weinsäure war also nicht zugegen; der mit Ammoniak neutralisierte Saft gab auf Zusatz von Calciumchloridlösung keinen Niederschlag; Oxalsäure war also abwesend. Der mit Kaliumcarbonat neutralisierte Saft gab beim Kochen auf Zusatz von Calciumchloridlösung einen Niederschlag von Calciumcitrat; das Filtrat von diesem gab auf Zusatz von Alkohol keinen Niederschlag; Äpfelsäure war also abwesend.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. Campara und S. Grimaldi (Gaz. chim. ital. 18, 441, 1888) extrahierten den Samen der weißen Lupine, *Lupinus albus*, mit Wasser, entfernten Protein- und Pektinstoffe und untersuchten nun nach der von *Post* (Traité complet d'analyse chimique) angegebenen Methode. Aus dem geklärten Calciumcitrat wurde die Citronensäure in schönen Kristallen erhalten.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (Pharm. Rundsch. New York 8, 59, 1890) fällte den wässrigen Blatterauszug von *Cephalanthus occidentalis* mit Bleiacetat, kochte die Bleisalze mit Alkohol aus und zersetzte dann mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde eingedampft und der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Man erhält so schon eine ziemlich gereinigte Säure, aus deren wässriger Lösung, wenn man mit etwas Chlorammon und einem Überschuß von Chlorcalcium und Ammoniak längere Zeit kocht, ein reichlicher Niederschlag von Calciumcitrat sich absetzt.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (Pharm. Rundsch. New York 8, 107, 1890) rührte zerquetschte Kranbeeren mit heißem Wasser an, versetzte mit einem geringen Überschuß von Kalkmilch und fügte dann einen geringen Überschuß von Salzsäure hinzu. Dann wurde abfiltriert, ausgewaschen und das Filtrat unter gelindem Erwärmen mit überschüssigem Ammoniak versetzt; die abgeschiedenen Flocken wurden abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und der Rückstand unter Zusatz von Ammoniak mit siedendem Wasser übergossen. Das nicht gelöste Calciumcitrat wurde abfiltriert und mit heißem Wasser gewaschen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Ölze (Sitzungsber. d. physik.-med. Soc. in Erlangen, Heft 22, S. 17, 1890) zog Frucht und Blätter der Preiselbeeren, *Vaccinium vitis idaea*, mit Wasser aus, fällte den wässrigen Auszug mit Bleiacetat und schüttelte das Filtrat vom Bleisulfid mit Äther aus. Der nach dem Abdestillieren des Äthers verbleibende Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, mit Natriumcarbonat neutralisiert, Kalkwasser und ein Überschuß von Calciumchlorid hinzugesetzt. Hierbei entstand ein Niederschlag, weswegen auf Weinsäure geschlossen wurde; das Filtrat vom weinsäuren Kalk gab beim Kochen einen weiteren Niederschlag, weswegen auf Citronensäure geschlossen wurde.

Der Nachweis ist unzureichend.

Edo Claassen (Pharm. Rundsch. New York 8, 262, 1890) untersuchte in der gleichen Weise wie *Cephalanthus occidentalis* auch *Rhus aromatica* und fand angeblich Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Belzung (Journ. de Botanique 5, 25, 1891) ließ junge Pflanzenteile der weißen Lupine, *Lupinus albus*, sich in einer Lösung von Calciumcitrat oder Calciumacetat (1 bis 3 g im Liter) entwickeln; unter den innegehaltenen Bedingungen vollzog sich die Keimung innerhalb mehrerer Wochen. „Betrachtet man die Zellen der Lupinen nach einigen Tagen Einfluß von Calciumnitrat unter dem Mikroskop, so überwuchern nach einigen Minuten zahlreiche kugelförmige Kristallhaufen, gebildet von kurzen Nadeln, mehr oder weniger gepreßt, ebenso häufig isolierte Nadeln oder Büschel die ganze schwammartige Zellsubstanz. Vergleiche mit dargestelltem Calciumcitrat ergaben Übereinstimmung.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Wilhelm Keim (Zeitschr. f. analyt. Chem. **30**, 401, 1891) versetzte den Saft der Sauerkirschen, *Prunus cerasus*, mit frisch gefälltem kohlen-sauren Kalk in nicht zu großem Überschuß, engte stark ein und fällte die Kalksalze durch Alkohol. Diese wurden dann mit kohlen-saurem Natron gekocht und dadurch in eine Lösung der Natronsalze umgewandelt. „Die durch Essigsäure neutralisierte Lösung wurde, um Äpfelsäure und Bernstein-säure in Lösung zu halten, mit Ammoniumacetat versetzt und darauf mit Calciumacetat bei Siedehitze behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und unter Zuhilfenahme von Essigsäure gelöst, mit Blei-acetat gefällt, filtriert, gewaschen, in Wasser suspendiert und durch Schwefel-wasserstoff zerlegt. Das Filtrat wurde verdunstet, mit 90proz. Alkohol ausgezogen und die Lösung abermals zur Trockne gebracht. Mit der auf diese Weise isolierten Citronensäure konnten die charakteristischen Reak-tionen ausgeführt werden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Salomon Frankfurt (Landw. Versuchsstat. **43**, 149, 1894) fällte den wässerigen Auszug ungekeimter Hanfsamen, *Canabis sativa*, mit Blei-acetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff, fällte noch zweimal mit Bleiessig und zerlegte den Bleiniederschlag wieder; das Filtrat wurde „konzentriert mit Kalkwasser gesättigt und eine Zeitlang gekocht; es schied sich ein kristallinisches Kalksalz aus, das in Chlorammonium-lösung löslich war. Die Reaktion beweist das Vorhandensein von Citronen-säure.“

Der Nachweis ist unzureichend.

W. Nacken (Forschungsberichte über Lebensmittel und ihre Beziehungen zur Hygiene, über forense Chemie und Pharmakognosie, **2**, 358, München, 1895) fällte 4 Liter Heidelbeersaft, *Vaccinium myrtillus*, mit Bleiacetat, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und entfernte aus dem Filtrat vom Bleisulfid durch Kochen mit Tierkohle den Farb- und den Gerbstoff. „Zur Trennung der einzelnen Säuren wurde das Verhalten ihrer Kalksalze benutzt. Ein Zusatz von Chlorkaliumlösung und Kalkwasser zum farblosen Filtrat rief keinen Niederschlag hervor, wodurch die Abwesenheit von Oxalsäure und Weinsäure nachgewiesen war. Eine alko-holische Kaliumacetatlösung gab ebenfalls auch nach längerem Kochen keine Fällung. Zur Abscheidung von Citronensäure wurde zum Sieden erhitzt, wobei sich eine reichliche Fällung zeigte, die auf dem Filter mit siedend heißem Wasser ausgewaschen wurde. Nach dem Eindampfen des Filtrats auf wenige Kubikzentimeter trat die Ausscheidung von äpfel-saurem Kalk ein, die durch Alkoholzusatz vervollständigt wurde.“

„Zur Identifizierung wurden die Niederschläge wie folgt weiter be-handelt: Die erste Fällung, die zu einem kleinen Teil aus kohlen-saurem Kalk bestand, wurde mit kaltem Wasser ausgelaugt, die Lösung mit Essig-säure schwach angesäuert und mit Bleiacetat gefällt. Durch Zersetzung der ausgewaschenen Bleifällung mit Schwefelwasserstoff wurde eine reine Citronensäurelösung erhalten, die auf dem Wasserbade zur Kristallisation eingedampft wurde. Die erhaltenen Kristalle wurden als Citronensäure durch den Schmelzpunkt und das charakteristische Verhalten ihres Bariumsalzes erkannt. Selbst nach wochenlangem Stehen blieb das Barium-salz amorph; dagegen zeigte dasselbe ein kristallinisches Gefüge, wenn es sich aus einer schwach mit Essigsäure angesäuerten Lösung abschied; unter dem Mikroskop betrachtet, in Gestalt kleiner, teils zu dichten Büscheln vereinigter Nadelchen.“

Die wenigen qualitativen Proben dürften nicht zureichend sein, um die Anwesenheit von Citronensäure in den Heidelbeeren sicherzustellen. *Der Nachweis ist unzureichend.*

A. Berg und C. Gerber [Bull. de la Soc. chim. de Paris (3) 15, 1050. 1896] wiesen Citronensäure und Äpfelsäure in Mesembryanthemum auf folgende Weise nach: die Pflanzenteile wurden mit Wasser ausgezogen, der Extrakt mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei ainedampft. Gibt die Lösung mit Kalkwasser einen Niederschlag, so wird die ganze Lösung bis zur schwach alkalischen Lösung damit versetzt, der Niederschlag abfiltriert und mit Essigsäure behandelt; bleibt ein unlöslicher Rückstand, so ist dies Calciumoxalat. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft und nach M. Mohlow [Bull. de la Soc. chim. (3) 4, 728] mit einer Lösung von 1proz. Resorcin in Schwefelsäure auf Weinsäure geprüft; Rotfärbung zeigt diese Säure an. Das Filtrat vom Calciumoxalat enthält noch Calciumcitrat und -malat. Das Calcium wird mit Ammoniumoxalat ausgefällt und das Filtrat eingedampft. Ein Teil wird auf Citronensäure in folgender Weise untersucht: Die Trockensubstanz wird mit dem fünf- bis sechsfachen Gewicht Schwefelsäure 66° Bé 1 bis 1,5 Stunden auf 50 bis 60° erhitzt, abgekühlt, das fünf- bis sechsfache Volumen Wasser hinzugefügt, mit Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung in zwei Teile geteilt. Der Rückstand des einen Teiles wird mit Wasser aufgenommen; tritt auf Zusatz von Eisenchloridlösung Violettfärbung ein, so ist Citronensäure vorhanden. Der Rückstand des anderen Teiles wird zu einer sehr verdünnten Natriumnitroprussidlösung, zu der ein Tropfen konzentrierter Sodalösung gegeben wurde, hinzugefügt; Rotorangefärbung zeigt Citronensäure an. „Die Anwendung dieser Methode erlaubte uns, Citronensäure und Äpfelsäure in einer großen Anzahl von Pflanzen und besonders in Mesembryanthemum zu entdecken, in welchem sie noch nicht beobachtet worden war.“

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Bornträger (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1. 160. 1898) sieht den Niederschlag, den er aus dem Saft der Granatäpfel, Punica granatum, nach dem Neutralisieren mit carbonatfreiem Alkali durch Calciumchloridlösung in der Hitze erhält, als zitronensauren Kalk an und ermittelt nach dem Veraschen des Niederschlags die Menge der Citronensäure durch Titration der Asche.

Der Nachweis ist unzureichend.

G. Paris (Chem.-Ztg. 26, 248, 1902) bestimmte nach der Methode von Bornträger und Paris (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 1, 158, 1898) in unreifen Erdbeeren, Fragaria vesca, die Citronensäure als zitronensaures Calcium.

Der Nachweis ist unzureichend.

I. O. Schlotterbeck und H. C. Watkins (The Journ. of the Amer. Chem. Soc. 25, 600, 1903) extrahierten die vollständigen zweijährigen Pflanzen des kletternden Erdrauchs, Adlumia cirrhosa, mit Wasser, fällten mit Bleiacetat, zerlegten den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und dampften das Filtrat vom Bleisulfid zur Trockne ein. Der Rückstand wurde mit Alkohol ausgekocht; aus der alkoholischen Lösung setzte sich beim Abkühlen ein kalkhaltiger Niederschlag ab. Dieser wurde in Essigsäure gelöst und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung behandelt, wobei ein Silberspiegel entstand. Die freie Säure wurde in der Kälte durch

Kalkwasser gefällt, aus welcher Reaktion auf Citronensäure geschlossen wird. Die freie Säure kristallisierte in den rhombischen Prismen der Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

R. Kunz und F. Adam (Zeitschr. d. österr. Apothekerver. 44, 243, 1906) bestimmten in den Johannisbeeren nach einem besonderen Analysengang die Menge der Citronensäure quantitativ. Die Methode ist zum qualitativen Nachweis der Citronensäure nicht ausreichend.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Schulze (Landw. Versuchsstat. 67, 83, 1907) entfettete die Samen der Zirbelkiefer, Pinus cembra, mit Äther, stellte dann einen wässerigen Auszug her, fällte diesen mit Bleiacetat und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde mit Strontiumhydroxyd neutralisiert, wobei eine Fällung entstand. „Die von dieser Fällung abfiltrierte Flüssigkeit lieferte beim Eindunsten eine dem Anschein nach kristallinische Abscheidung, die abfiltriert wurde; das Filtrat gab bei weiterem Einengen noch ein neues Quantum der gleichen Substanz. Dieses Produkt glich im Aussehen der Abscheidung, die man erhält, wenn man eine verdünnte wässrige Citronensäurelösung in der gleichen Weise behandelt. Die aus dieser Strontiumverbindung mit Schwefelsäure in Freiheit gesetzte Säure gab die von O. v. Spindler (Chem.-Ztg. 28, 148) beschriebene Reaktion auf Citronensäure. Diese Reaktion beruht auf dem Verhalten der Citronensäure gegen Quecksilbersulfat und Bichromatlösung.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Marmaduke Barrowcliff und Frank Tutin (Journ. of the Chem. Soc. of London 91, 1915, 1907) extrahierte die wässerigen Auszüge der Wurzel von Morinda Longiflora mit Äther und behandelte die so gewonnenen Säuren mit Bariumacetatlösung, bis sich kein Niederschlag mehr bildete; das Filtrat vom Barytniederschlag wurde mit basischer Bleiacetatlösung gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid eingengt, mit Sägemehl gemischt, getrocknet und mit Äther extrahiert. Der Rückstand der Ätherextraktion „aus Essigester umkristallisiert, schmolz bei 151 bis 152° und gab die Reaktionen der wasserfreien Citronensäure“.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Muttelet (Ann. d. Falsific. 2, 383, 1909) bestimmte in den Erdbeeren, Fragaria vesca, Himbeeren, Rubus idaeus, und Johannisbeeren, Ribes rubrum, nach einem besonderen Analysengang die Menge der Citronensäure; es ist schon in den vorhergehenden Arbeiten darauf hingewiesen worden, daß dieser Analysengang zum sicheren Nachweis der Citronensäure nicht geeignet ist.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Scurti und G. de Plato (Le Stazioni sperimentali agrarie italiane 41, 435, 1908) behandelten den Bleiniederschlag des Orangensaftes bei 70° mit Essigsäure, wodurch äpfelsaures Blei gelöst wurde, zerlegten den unlöslichen Teil mit Schwefelwasserstoff und teilten das Filtrat vom Bleisulfid in zwei Teile; in dem einen Teil wurde Bernsteinsäure als basisches Ferrisalz nachgewiesen; „der andere Teil wurde auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen gebracht, drei Volumina Wasser hinzugefügt und nun

Bariumacetatlösung hinzugesetzt; die sofortige Abscheidung von Bariumcitrat erweist die Gegenwart von Citronensäure“.

Der Nachweis ist unzureichend.

J. M. Albahary (Ann. d. Falsific. 5, 147, 1912; C. r. 144, 1232, 1907) bestimmte nach einem besonderen Analysengang in einer großen Reihe von Früchten die Menge der Citronensäure und Äpfelsäure. Citronensäure wurde in folgenden Früchten gefunden: Citronen, Citrus Limonum, Äpfel, Pirus malus, Birne, Pirus communis, Pflaume, Prunus domestica, Reineclaude, Prunus italia, Pfirsich, Prunus persica, Aprikose, Prunus armeniaca, Kirsche, Prunus avium, Sauerkirsche, Prunus cerasus, Weintrauben, Vitis vinifera, Erdbeeren, Fragaria vesca, Himbeere, Rubus idaeus, Johannisbeere, Ribes rubrum, schwarze Johannisbeeren, Ribes nigrum, Moosbeeren, Vaccinium oxycoccos. In den vorhergehenden Arbeiten wurde schon darauf hingewiesen, daß dieser Analysengang zum sicheren Nachweis der Citronensäure nicht geeignet ist.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Wosolsobe und J. Zellner (Monatsh. f. Chem. 85, 1525, 1914) untersuchten den wässerigen Auszug der Tabakwurzeln, Nicotiana Tabacum, nach der Methode von Albahary. Die Reaktion von Denigès trat in sehr kräftiger Weise und die von Stahre (Zeitschr. f. analyt. Chem. 8, 195, 1897) ganz deutlich auf, „so daß die Anwesenheit von Citronensäure und Äpfelsäure höchst wahrscheinlich ist“.

Der Nachweis ist unzureichend.

C. Hartwich und E. Zwicky (Apotheker-Ztg. 29, 936, 1914) versuchten, in Mesembryanthemum expansum und M. tortuosum Citronensäure mikrochemisch nachzuweisen. „In den Blättern der trockenen Droge fielen neben Raphiden reichliche weiße Punkte auf, die sich als kugelige Gebilde von kristallinischer Struktur erwiesen. Die mikrochemische Untersuchung wies Magnesium, Phosphorsäure und Citronensäure in ihnen nach.“ Die Citronensäure wurde in einem wässerigen Auszug der Droge noch wie folgt nachgewiesen: 1. Mit Silbernitrat (Behrens, Mikrochemische Analyse, S. 52, 1897) entstand eine weiße flockige Fällung, die beim Erwärmen sich teilweise löste und nach dem Versetzen mit Essigsäure beim Erkalten kleine linsenförmige Kristalle abscheidet; daneben waren häufig trübe Kugeln und quadratische Blättchen wahrnehmbar; diese verschiedenen Gebilde sind charakteristisch für Silbercitrat.“ 2. „Mit Wismutnitrat entstand zuerst eine flockige Fällung, die später kristallinisch wurde und die für Wismutcitrat charakteristischen linsen- und stäbchenförmigen Kristalle zeigte.“ 3. „Mit Kupfersulfat, 1 %, und Kupferacetat, 5 %, wurden die charakteristischen Sphäroliten und Sternchen von Kupfercitrat sehr schön erhalten.“ 4. „Mit Denigès Reagens entstand nach längerem Stehen ein weißer kristalliner Niederschlag, der sedimentiert wurde und kleine rhombische Kriställchen erkennen ließ.“ 5. „Mit Stahres Reagens entstanden zuerst gallertartige Fällungen, die später kristallinisch wurden und deutlich die charakteristischen Briefkuvertformen zeigten.“

Der Nachweis ist unzureichend.

T. C. N. Bröckmüt (Pharm. Weekblad voor Nederland 58, 1033, 1916) wendet zum Nachweis der Pflanzensäuren zunächst die Jodoformprobe an; fällt diese positiv aus, so kann Äpfelsäure und Citronensäure vorhanden sein. Gibt der Saft jetzt auf Zusatz von Bariumacetat eine kristalline Abscheidung, so ist Citronensäure zugegen, da Äpfelsäure unter

gleichen Umständen keinen Niederschlag liefert. Auf diese Weise wurde im Citronensaft, *Citrus Aurantium*, Apfelsinensaft, *Citrus Limonum*, und im Pfirsichsaft, *Prunus Persica*, Citronensäure nachgewiesen. Im Tamarindensaft, *Tamarindus indica*, und Apfelsaft, *Pirus malus*, konnte Citronensäure nicht aufgefunden werden. Der Apfelsaft enthält nun, wie wir in einer besonderen Arbeit zeigen werden, recht erhebliche Mengen Citronensäure, so daß die Methode unzulänglich ist.

Der Nachweis ist unzureichend.

W. D. Bigelow und P. B. Dunbar (The Journ. of Ind. and Eng. Chem. 9, 762, 1917) untersuchten verschiedene Früchte nach der Methode von Pratt (U. S. Dept. Agr. Bur. of Chem. Circular 88, Zitat war nicht zugänglich), indem sie die Säure als Bariumcitrat fällten und durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in Aceton überführten und dieses in *Deniges* Reagens auffingen. „Die *Prattsche* Methode wurde in den meisten Fällen angewandt, aber nur qualitative Schlüsse daraus gezogen.“ Es wurde so Citronensäure gefunden in einigen Birnenarten, Johannisbeeren, *Ribes rubrum*, Stachelbeeren, *Ribes grossularia*, Preiselbeeren, *Vaccinium macrocarpum*, Granatäpfel, *Punica granatum*, Heidelbeeren, *Vaccinium Myrtillus*.

Der Nachweis dürfte unzureichend sein.

Bornträger (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 5, 147, 1902) kochte Früchte mit Wasser aus, erwärmte die Filtrate mit Chlorcalcium und etwas Essigsäure, wobei niemals oxalsaures Calcium niederfiel. „Beim späteren Neutralisieren mit Ammoniak fielen zwar meistens geringe bis starke, gelbe bis braunrote Flocken nieder, aber es schied sich kein wein- oder traubensaures Calcium und beim darauf folgenden Aufkochen fast nie zitronensaures Calcium ab. Nur in den unreifen Früchten der japanischen Mispel, *Eryobotrya japonica*, wurde ziemlich viel Citronensäure gefunden.“

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Hilger und R. Gross (Landw. Versuchsstat. 33, 178, 1887) untersuchten verschiedene Organe des Weinstocks, *Vitis vinifera*, auf die darin enthaltenen Säuren. Aus jungen Trieben, Ranken und unreifen Früchten wurden wässerige Auszüge hergestellt und aus diesen in der Hitze durch Essigsäure die Eiweißstoffe entfernt; das Filtrat wurde in der Kälte mit basischem Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Bleisulfid abfiltriert und das Filtrat mit Tierkohle möglichst entfärbt; die Flüssigkeit wurde dann eingedampft und der Rückstand der Kristallisation überlassen; nach längerem Stehen schieden sich reichliche Kristallmengen ab, die abgesaugt und getrocknet wurden. Um in diesen Kristallisationen die darin enthaltenen Säuren nachzuweisen, wurde nach zwei verschiedenen Methoden verfahren.

Erste Methode. Zuerst wurde in alkoholischer Lösung mit essigsaurem Kali die Weinsäure als Bitartrat abgeschieden, dann Kalkwasser bis zur schwach sauren Reaktion hinzugefügt und dadurch die Oxalsäure entfernt. „Nun wurde die Lösung vollständig mit Kalkwasser neutralisiert und wiederum längere Zeit stehen gelassen, um weinsäuren, oxalsäuren und zitronensäuren Kalk abzuscheiden. Dieser wurde abfiltriert und der Niederschlag durch etwa 10 Minuten andauerndes Erwärmen auf dem Wasserbade mit Kalilauge getrennt. Weinsaurer Kalk geht in Lösung, zitronen- und oxalsaurer nicht . . .“ „Um diese zu trennen, wurde zu dem Rückstand Essigsäure gefügt, wodurch zitronensaurer Kalk in Lösung ging, während der nun bleibende Rückstand nur noch Oxalsäure enthielt.“

Zweite Methode. „Der zweite Teil der gesättigten Säurelösung wurde zunächst mit Ammoniak neutralisiert und bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, dann nochmals mit Ammoniak neutralisiert, ungefähr das zweifache Volumen Alkohol zugegeben und die gesamte Masse stehen gelassen. Nach mehreren Tagen hatte sich eine Kristallmasse abgeschieden, die aus weinsaurem, oxalsaurem und zitronensaurem Ammon bestehen konnte. Zur Trennung wurde mit Wasser aufgenommen, mit Essigsäure angesäuert und mit essigsaurem Kali, gelöst in Alkohol, die Weinsäure ausgefällt.“ Aus dem Filtrat wurde mit ein paar Tropfen Chlorcalcium die Oxalsäure abgeschieden, nachdem „die Mutterlauge mit Kalkwasser neutralisiert und mit gleichen Teilen Alkohol versetzt war, schied sich ein nicht allzu voluminöser Niederschlag ab, der nur Citronensäure sein konnte“. „Das Filtrat des Ammoniakniederschlags konnte nur aus Citronensäure und Äpfelsäure bestehen. Zur Trennung dieser beiden wurde mit Calciumhydroxyd neutralisiert und nach Zusatz von Chlorcalcium längere Zeit im Sieden gehalten. Schied sich zitronensaurer Kalk während des Kochens ab, so wurde er abfiltriert und durch Zusatz von wenig Alkohol die noch in Spuren vorhandene Citronensäure abgeschieden und dann durch überschüssigen Alkohol die Äpfelsäure als äpfelsaurer Kalk gefällt.“ „Die Erkennung der Citronensäure in den erhaltenen Fällungen war auf folgende Reaktionen basiert: Schwerlöslichkeit des Bariumsalzes, Untersuchung des reinen Bariumsalzes, Inaktivität der Citronensäure gegen das polarisierte Licht.“ „Die Resultate der Untersuchung haben die Gegenwart folgender Säuren festgestellt: 1. In den Ranken: Weinsäure, Äpfelsäure, Oxalsäure, Citronensäure, Bernsteinsäure. 2. In den Blättern: Weinsäure in großer Menge, Äpfelsäure, Oxalsäure, Citronensäure.“

Die analytischen Operationen sind nur zum Teil verständlich. Die angegebenen qualitativen Reaktionen genügen keineswegs, um die Gegenwart von Citronensäure sicherzustellen.

Der Nachweis ist unzureichend.

R. Kissling (Chem.-Ztg. 22, 2, 1898) bestimmt im Tabak, Nicotiana Tabacum, die Citronensäure auf folgendem Wege: 10 g Tabakpulver werden mit überschüssiger verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit Bimssteinpulver gemischt und mit Äther extrahiert. Dem Extrakt werden durch Schütteln mit Wasser die Säuren entzogen und der Äther verdampft. In der wässrigen Lösung ist jetzt Essigsäure, Oxalsäure, Äpfelsäure und Citronensäure enthalten. Zunächst wird die Oxalsäure durch Calciumacetat als Calciumoxalat ausgefällt. Zu dem Filtrat wird so lange verdünnte Bleiacetatlösung hinzugefügt, bis ein sich sofort in Essigsäure auflösender Niederschlag entsteht. In diesem Augenblick ist die Citronensäure fast vollständig ausgefällt. Das zitronensaure Blei wird abfiltriert, verascht und aus der Menge des Bleioxyds die Citronensäure berechnet.

Zum Nachweis der Citronensäure ist die Methode ungeeignet.

R. Kissling (Chem.-Ztg. 23, 3, 1899) wendet zur quantitativen Bestimmung von Oxalsäure, Äpfelsäure und Citronensäure im Tabak, Nicotiana Tabacum, das folgende Verfahren an: der mit Schwefelsäure angesäuerte Tabak wird mit Äther extrahiert, die Säuren in Wasser aufgenommen und die Lösung mit Barytlösung titriert. Durch Zusatz von 20proz. Alkohol wird zunächst Bariumoxalat und -citrat fast vollständig ausgefällt und durch Zusatz von 70proz. Alkohol dann das Bariummalat. In einer besonderen Probe wird die Menge der Oxalsäure ermittelt. Nach

Kissling ist diese Methode keine quantitative, jedoch eine ziemlich befriedigende. Bei Vergleichsversuchen wurden annähernd die zugesetzten Mengen der drei Säuren wiedergefunden.

Zum Nachweis der Citronensäure ist diese Methode unzureichend.

R. G. Pelly (The Journ. of the Soc. of chem. Ind., London, 82, 778, 1913) erhielt aus dem Extrakt der Früchte des Affenbrotbaumes, *Adansonia digitata*, einen Bleiniederschlag und aus diesem nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff eine kristalline Masse, die hauptsächlich aus Citronensäure bestand. Sie wurde durch ihr Calciumsalz und durch den Methyl-ester vom Schmelzpunkt 77° gekennzeichnet.

Es dürfte wohl wahrscheinlich sein, daß in den Früchten des Affenbrotbaums Citronensäure enthalten ist.

Arbeiten, in denen die Anwesenheit von Citronensäure in Pflanzen durch quantitative Analyse der Säure selbst oder ihrer Abkömmlinge festzustellen versucht wird.

A. Chodnew (Ann. d. Chem. 58, 283, 1845) extrahierte unreife Stachelbeeren, *Ribes grossularia*, mit Wasser, fällte mit Bleiessig, zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff und sättigte das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkmilch; beim Kochen entstand ein Niederschlag. „Die schwer lösliche Kalkverbindung bestand meistens aus basisch zitronensaurem Kalk und einer sehr geringen Menge neutralem äpfelsauren Kalk, der wegen seiner großen Löslichkeit von dem ersteren Salz durch Auswaschen mit Wasser getrennt wurde. Der basisch zitronensaure Kalk, in Wasser gelöst, mit salpetersaurem Silber behandelt, gab ein zitronensaures Salz, dessen Analyse und Atombestimmung auf ein zitronensaures Doppelsalz von Kalk und Silberoxyd schließen ließ.“ $C_{12}H_5O_{11}$, 2 AgO, 2 CaO. „Diese sonderbare Verbindung, die zweimal erhalten wurde, erfordert, daß die Untersuchung der in unreifen Stachelbeeren vorkommenden Säuren noch einmal wiederholt werde.“

Der Nachweis ist unzureichend.

Robert Schwarz (Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 6, 456, 1851) fällte den wässerigen Auszug des Waldmeisters, *Asperula odorata*, mit Bleiacetat, behandelte den Bleiniederschlag mit Essigsäure, zerlegte das darin Unlösliche mit Schwefelwasserstoff und teilte das Filtrat vom Bleisulfid in drei Teile. Der eine Teil wurde mit Bleiacetat vollständig ausgefällt und die anderen Teile hinzugesetzt. Der Niederschlag, welcher zum größten Teil aus Bleiphosphat und -sulfat bestand, wurde nach längerem Digerieren abfiltriert, das Filtrat mit Bleiacetat vollständig ausgefällt, der Niederschlag mit Essigsäure behandelt, vom Ungelösten abfiltriert und die Lösung mit dreibasisch essigsaurem Blei gefällt. Der Niederschlag wurde mit Weingeist ausgewaschen und bei 100° getrocknet. Das Bleisalz gab bei der Elementaranalyse Werte, welche auf die Formel $C_{26}H_{31}O_{49}(PbO)_{13}$ stimmten. Verfasser nimmt an, daß der Niederschlag aus einem Gemisch von verschiedenen basischen Salzen der Citronensäure besteht und gibt auch eine Formel dafür an, die natürlich jeglicher Grundlage entbehrt. Es gelang ihm nicht, die Citronensäure in kristallisierter Form abzuscheiden. Die wässrige Lösung der Säure gab jedoch alle Reaktionen der Citronensäure.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Willigk (Ann. d. Chem. 82, 343, 1852; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 8, 18, 1852) fällte den wässerigen Auszug von Krappblättern, *Rubia tinctorum*, mit Bleiacetat, um die Gerbstoffe zu entfernen, und dann das Filtrat mit basischem Bleiacetat. Der Niederschlag wurde mit verdünnter Essigsäure digeriert, um die letzten Spuren Gerbsäure zu beseitigen. Das in Essigsäure Unlösliche wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid eingedampft; nach einiger Zeit schieden sich Kristalle ab, die das Aussehen von kristallisierter Zitronensäure hatten. Die ganze Masse wurde mit 98proz. Alkohol behandelt, filtriert, das Filtrat mit alkoholischer Bleiacetatlösung gefällt, der Niederschlag mit Alkohol gewaschen und bei 100° getrocknet. Die Analysen stimmten auf $4(C_{12}H_5O_{11}, HO) 9 PbO$.

Der Nachweis ist unzureichend.

Robert Schwarz (Ann. d. Chem. 83, 57, 1852; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 8, 29, 1852) untersuchte das Labkraut, *Galium aparine* und *Galium verum*. Der wässrige Auszug des Krautes wurde mit basischem Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkmilch versetzt und dadurch Gerbsäure, Phosphorsäure und Schwefelsäure ausgefällt. Das Filtrat, in welchem zitronensaurer Kalk enthalten ist, wird durch Schwefelsäure zerlegt und das Filtrat vom Gips eingedampft. Aus dem Sirup scheiden sich nach mehrtägigem Stehen kleine, harte, körnige Kristalle ab, die unter dem Mikroskop denen der Zitronensäure gleichen. Die Lösung der Kristalle gab alle Reaktionen der Zitronensäure. Der aus der Lösung durch Bleiacetat erhaltene Niederschlag wurde analysiert. Die Analyse stimmt auf eine Doppelverbindung von zitronensaurem und essigsaurem Blei.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Kavalier [Journ. f. prakt. Chem. (1) 60, 321, 1853] unterwarf den weingeistigen Auszug der Nadeln der Kiefer, *Pinus silvestris*, der Destillation, wobei flüchtige Öle übergingen. Der Rückstand war nach Zugabe von Wasser eine trübe Flüssigkeit, die durch einige Tropfen Bleizuckerlösung geklärt und dann filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit Bleiacetatlösung und dann in der Siedehitze mit basischer Bleiacetatlösung gefällt: das Filtrat von den Bleisalzen wurde entbleit und im Kohlendioxidstrom eingedampft. Aus dem Eindampfrückstand konnte der Verfasser auf verwickelte Weise einen Körper erhalten, den er für Zitronensäure hält. Die Analyse des Bleisalzes stimmt lediglich auf zitronensaures Blei. Trotz der stimmenden Analyse dürfte nach der ganzen Art der Abscheidung kaum Zitronensäure vorgelegen haben.

Der Nachweis ist unzureichend.

Dessaigues (Ann. d. Chem. 89, 120, 1854; C. r. 37, 782, 1852) konzentrierte die aus *Boletus pseudo ignarius* erhaltene rohe Säure (wie, ist nicht angegeben), wodurch Fumarsäure auskristallisierte; das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert und dann mit Chlorcalcium gefällt. Von phosphorsaurem Kalk wurde abfiltriert und das Filtrat erhitzt. Dabei schied sich ein kristallinisches Pulver ab; dieses wurde in schwacher Salpetersäure gelöst und mit Bleiacetat gefällt. Das nicht kristalline Bleisalz wurde wiederholt mit Wasser gekocht. Der in Wasser unlösliche Teil wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt; aus dem eingedampften Filtrat wurden Prismen erhalten, „deren Eigenschaften vollkommen mit Zitronensäure übereinstimmten“. Eine Silberbestimmung gab gut auf zitronensaures

Silber stimmende Werte. Eine einzige Silberbestimmung dürfte nicht genügen, um eine Säure sicher zu kennzeichnen.

Der Nachweis ist unzureichend.

A. Schrader (Ann. 121, 370, 1862) untersuchte den bei der Zuckergewinnung aus Rüben, *Beta vulgaris*, in den Eindampfapparaten entstehenden Kalkniederschlag. Dieser wurde in viel kaltem Wasser gelöst, die Lösung mit Bleiacetat gefällt und der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid gab nach dem Eindampfen eine amorphe zähe braune Masse, deren konzentrierte wässrige Lösung auf Zusatz von Alkohol nicht saure Körper abschied. Das Filtrat gab beim Einengen Kristalle, die umkristallisiert die Reaktionen der Citronensäure zeigten. Das bei 130° getrocknete Bleisalz gab leidlich auf zitronensaures Blei stimmende Blei- und Kohlenwasserstoffwerte. Analysen des Bleisalzes sind nicht zureichend, um Citronensäure sicher zu kennzeichnen.

Der Nachweis ist unzureichend.

F. Rochleder [Journ. f. prakt. Chem. (1) 98, 205, 1866] fällte den wässerigen Auszug der Rinde der Wurzel des Apfelbaums, *Pirus malus*, mit Bleizucker, verteilte den Bleiniederschlag in Wasser und fügte Essigsäure hinzu, wodurch ein Teil des Niederschlags gelöst wurde. Das Ungelöste wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Bleisulfid im Vakuum bis zur Sirupdicke eingedampft und der Rückstand zur Entfernung von Pektinstoffen mit Alkohol behandelt. Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet, wobei sich Kristalle bildeten. Die Kohlenwasserstoffbestimmung gab Werte, welche auf die Formel $C_{48}H_{30}O_{54}$ stimmten. Diese Formel wird auseinandergezogen zu $C_{12}H_6O_{12}$, $3(C_{12}H_6O_{14})$. Die lufttrockene Substanz muß die Zusammensetzung der Citronensäure gehabt haben, da sie beim Trocknen 6,74 % Wasser verlor.

Der Nachweis ist unzureichend.

Gottlieb Stein (Ber. d. deutsch. chem. Ges. 12, 1603, 1879) preßte *Drosera intermedia* kurz vor der Blütezeit aus, fällte den Preßsaft mit essigsaurem Blei und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde auf dem Wasserbade eingengt, der zurückbleibende Sirup kristallisierte nach kurzer Zeit fast vollständig. Das aus der kristallisierenden Säure gewonnene Bleisalz gab gut auf zitronensaures Blei stimmende Bleiwerte.

Der Nachweis ist unzureichend.

K. Andrlík (Zeitschr. f. Zuckerindustr. in Böhmen 24, 645, 1899/1900) kochte den Sättigungsschlamm der Zuckerfabrikation, *Beta vulgaris*, mit Sodalösung und verwandelte dadurch die Kalksalze in leicht lösliche Natriumsalze. Nachdem die Lösung der Natriumsalze durch Salzsäure teilweise neutralisiert worden war, wurde mit Essigsäure angesäuert und in der Wärme durch Calciumchlorid die Oxalsäure ausgefällt. Das Filtrat vom Calciumoxalat wurde auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Ammoniak neutralisiert und durch Alkohol die Natronsalze ausgefällt. Die noch kalkhaltigen, gefärbten Salze wurden in mit Essigsäure angesäuertem warmen Wasser gelöst, die Lösung mit Blutkohle entfärbt und durch Ammoniak kieselaurer Kalk ausgefällt. Das Filtrat hiervon wurde gekocht, wobei ein reichlicher Niederschlag von weißer Farbe entstand. Dieser wurde in verdünnter Essigsäure gelöst, mit Ammoniak neutralisiert und gekocht, wobei ein aus mikrokristallinen Nadeln bestehender Nieder-

schlag ausfiel. Das Kalksalz, Kalk- und Wasserbestimmung, gab schlecht auf zitronensauren Kalk stimmende Werte. Verfasser glaubt, daß das Salz noch nicht vollkommen trocken war.

Der Nachweis ist unzureichend.

E. Goupil [Ann. de Chim. et de Phys. (3) 17, 503, 1846] fällte den filtrierten heißen wässerigen Auszug der Tabakblätter, *Nicotiana Tabacum*, mit Bleiacetatlösung und zerlegte den Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat wurde nochmals mit Bleiacetatlösung gefällt, wieder mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Verfahren nochmals wiederholt. Aus dem Filtrat vom Bleisulfid „setzten sich nach mehreren Wochen kleine, spitze und harte Kristalle ab“, die umkristallisiert und von beigemengtem Kalk gereinigt wurden. „Diese Kristalle haben das Aussehen von Citronensäure; wenn man sie destilliert, liefern sie Aconitsäure. Das Bleisalz gab eine gut auf zitronensaures Blei stimmende Bleibestimmung.

Das Auftreten von Aconitsäure bei der Destillation der Säure und die gut stimmende Bleibestimmung des Bleisalzes lassen es immerhin als wahrscheinlich erscheinen, daß in den Tabakblättern Citronensäure enthalten ist.

F. Rochleder (Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 56, 140, 1867; Journ. f. prakt. Chem. 102, 103, 1867) fällte den klaren wässerigen Auszug der Stammrinde des Apfelbaums, *Pirus malus*, und der Roßkastanie, *Aesculus Hippocastanum*, mit Bleizucker, verteilte den Bleiniederschlag in wenig Wasser und versetzte mit Essigsäure. Der unlösliche Anteil wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Bleisulfid bis zum Sirup eingedampft. Durch Alkohol wurden dann die Pektinstoffe entfernt. Aus der alkoholischen Lösung wurde weiter die Säure der Apfelbaumstammrinde, welche Citronensäure ist, gewonnen. Sie wurde bei 100° getrocknet und lieferte Kohlenwasserstoffwerte, die gut auf $C_{12}H_8O_{14}$ stimmten. Aus 3,5 kg Rinde wurden 0,5 g Säure erhalten. „Die Stammrinde von *Aesculus Hippocastanum* liefert gleichfalls Citronensäure.“ „Große Rindenmengen muß man in Arbeit nehmen, um nur wenig Material zu einer Analyse zu haben.“

Es dürfte sicher sein, daß in der Stammrinde des Apfelbaums Äpfelsäure enthalten ist: der Nachweis der Citronensäure in der Stammrinde der Roßkastanie ist unzureichend.

C. R. Alder Wright und G. Patterson (Journ. Chem. Soc. London 33, 78, 1878) entfernten aus dem Saft unreifer Maulbeeren, *Morus nigra*, die schleimigen Bestandteile durch Behandeln mit Alkohol, verjagten ihn wieder und neutralisierten mit Ammoniak. Auf Zusatz von Calciumchloridlösung entstand in der Kälte kein Niederschlag; nach ½stündigem Erhitzen fiel ein sandiges Calciumsalz aus. Aus dem Kalksalz wurde durch Zersetzen mit Schwefelsäure die freie Säure erhalten, welche sich als Citronensäure erwies. Aus der Säure wurde nochmals das Kalksalz hergestellt und dieses bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Wasserbestimmung gab keinen guten Wert. Die Kalkbestimmung in dem wasserfreien Salz dagegen einen guten Kalkwert.

Es dürfte vielleicht wahrscheinlich sein, daß in den Maulbeeren Citronensäure enthalten ist.

Fr. Rochleder und E. Willigk [Journ. f. prakt. Chem. (1) 56, 72, 1852; Ann. d. Chem. 80, 287, 1851; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 6, 546, 1851] fällten den wässerigen Auszug des Krautes und der Wurzel von *Richardsonia scabra* mit Bleiacetat, kochten den Bleiniederschlag

mit verdünnter Essigsäure aus, filtrierten nach dem Erkalten vom Unlöslichen ab, versetzten das Filtrat mit etwas Ammoniak, wodurch ein gelber Niederschlag entstand, der in Alkohol verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde mit alkoholischer Bleiacetatlösung gefällt, der Niederschlag entbleit und das Filtrat vom Schwefelblei so lange mit Bleiacetatlösung versetzt, als der Niederschlag rein weiß erschien. Das Bleisalz wurde bei 100° getrocknet. Seine Analyse stimmte auf ein kompliziert zusammengesetztes basisches zitronensaures Blei. Aus dem Bleisalz wurde die freie Säure hergestellt, wobei Kristalle erhalten wurden, deren Elementaranalyse gut auf Citronensäure stimmte.

Es dürfte wohl sicher sein, daß im Kraut und in der Wurzel von Richardsonia scabra Citronensäure enthalten ist.

Wittstein (Wittsteins Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharm. 6, 192, 1857) dampfte 50 Unzen Blutungssaft der Weinrebe, Vitis vinifera, bei gelinder Wärme ein, filtrierte vom ausgeschiedenen weinsauen Kalk ab und fällte das Filtrat mit Bleiacetatlösung. Der Bleiniederschlag wurde mit Essigsäure behandelt, worin er sich fast vollständig löste. Die klare essigsaure Lösung ließ beim Neutralisieren mit Ammoniak einen weißen Niederschlag fallen, der mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde zunächst auf dem Wasserbade, dann im Exsikkator eingedunstet, „wo zuletzt eine weiße kristallinische luftbeständige Rinde von stark unangenehmem saurem Geschmack hinterblieb, die mit Kali keine Reaktion auf Weinsäure gab“. Aus der Säure wurde das Silbersalz hergestellt, dessen Elementaranalyse gut auf zitronensaures Silber stimmte.

Es dürfte wohl sicher sein, daß im Blutungssaft der Weinreben Citronensäure enthalten ist.

F. Rochleder (Journ. f. prakt. Chem. 107, 385, 1869; Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 59, 819, 1869) fällte den wässerigen Auszug der Blätter der Sauerkirsche, Prunus cerasus, Cerasus acida, mit Bleiacetatlösung, zerlegte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und versetzte das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkwasser im Überschuß. Das Filtrat vom Kalkniederschlag wurde mit Essigsäure schwach angesäuert, mit Bleiacetatlösung gefällt, der Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Bleisulfid zum Sirup eingeeengt. Nach mehrtägigem Stehen kristallisierte Citronensäure aus. Die Elementaranalyse gab gut auf Citronensäure stimmende Werte.

Auch in der Rinde des Sauerkirschenbaums soll Citronensäure vorhanden sein; der Nachweis ist jedoch unzureichend. *Es dürfte sicher sein, daß in den Blättern der Sauerkirsche Citronensäure vorhanden ist.*

Ad. Beyer [Arch. d. Pharm. (2) 151, (3) 1 (ganze Serie 201), 40, 1872; Landw. Versuchsstat. 14, 1871] untersuchte Lupinensamen. „Die wässerige Lösung des alkoholischen Lupinenextrakts, aus welchem das noch zu beschreibende wachsartige Fett abgeschieden war, wurde direkt mit essigsaurem Bleioxid gefällt. Nach mehrfachem Auswaschen wurde der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Es resultierte nach Entfernen des Schwefelbleies und Eindampfen eine stark saure Flüssigkeit. Barytwasser erzeugte in derselben einen zuerst verschwindenden, dann aber bleibenden kristallinischen Niederschlag. Durch fraktionierte Fällung wurde dieses Barytsalz vollkommen frei von Phosphorsäure erhalten. Um dies zu erreichen, muß die Flüssigkeit bis zuletzt stark sauer sein. Die Mutterlauge

enthält neben einem Teil nicht gefällter Citronensäure alle Phosphorsäure in Lösung.“ Aus dem Barytsalz wurde die freie Säure gewonnen und aus dieser das Kalk- und Silbersalz hergestellt. Die Elementaranalyse des Silbersalzes gab gut auf citronensaures Silber stimmende Werte. Das bei 100° getrocknete Kalksalz gab gut auf citronensauren Kalk stimmende Calciumwerte.

Es dürfte sicher sein, daß in den Lupinensamen Citronensäure enthalten ist.

Oma Carr (Journ. Amer. Chem. Soc. 15, 144, 1893) untersuchte den Pfannenstein, der bei der Zuckerfabrikation aus chinesischem Zuckerrohr, Saccharum officinarum, entsteht. Aus dem Pfannenstein wurde durch Zerlegen mit Schwefelsäure bzw. Essigsäure die freie Säure und weiterhin das Bleisalz dargestellt. Auch aus reiner Citronensäure wurde für Vergleichszwecke das Bleisalz gewonnen. Die Analyse der verschiedenen Salze (Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Bleibestimmung) gaben gut übereinstimmende Werte. Durch verschiedene Farbenreaktionen wurde dann noch die Gleichheit der Säure aus dem Pfannenstein mit Citronensäure festgestellt.

Es dürfte sicher sein, daß im Safte des Zuckerrohrs Citronensäure enthalten ist.

Aparin (Journ. d. russ. physik.-chem. Ges. 35, 811, 1903; Ref. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 8, 254, 1904) mischte Moosbeerensaft, Vaccinium oxycoccos, mit Sand, trocknete die Mischung und extrahierte dann im Soxhlet mit Äther. Der ätherische Extrakt wurde mit heißem Wasser aufgenommen, nach dem Erkalten Öl und Wachs abfiltriert und das Filtrat mit Bleiacetat gefällt. Die Lösung des mit Schwefelwasserstoff zerlegten Bleiniederschlags wurde zur Sirupdicke eingedampft und im Exsikkator getrocknet, wobei nach längerem Stehen eine undeutlich kristalline Masse entstand. Sie wurde mit Wasser aufgenommen und die Lösung mit Kreide neutralisiert. Beim Erhitzen entstand ein farbloser, in Ammoniak löslicher Niederschlag. Das Calciumsalz wurde mit der berechneten Menge Oxalsäure zersetzt, das Filtrat vom Calciumoxalat eingedampft und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die hierbei erhaltenen Kristalle schmolzen bei 99°, während Citronensäure bei 100° schmelzen soll. Aus der freien Säure wurde das Blei-, Calcium- und Bariumsalz hergestellt und von diesen Metallbestimmungen ausgeführt, die gut stimmende Werte lieferten. Ferner wurde noch die freie Säure der Elementaranalyse unterworfen und auch hier gut stimmende Werte erhalten.

Es dürfte sicher sein, daß in den Moosbeeren Citronensäure enthalten ist.

Rochleder (Ber. d. Wien. Akad. d. Wissensch. 4, 433, 1851; Ann. d. Chem. 80, 321, 1851) fällte den heißen wässrigen Auszug der Krappwurzel, Rubia tinctorum, mit Bleiacetatlösung, zersetzte den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und teilte das Filtrat vom Bleisulfid in drei Teile. Der eine Teil wurde mit Bleiacetatlösung gefällt, die beiden anderen Teile hinzugefügt, 24 Stunden stehen gelassen und der Niederschlag, „der nur wenig citronensaures Bleioxyd, viel schwefelsaures und etwas phosphorsaures Bleioxyd enthält“, abfiltriert. Das Filtrat wird durch basisches Bleiacetat vollkommen ausgefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Schwefelblei „im Vakuum über Schwefelsäure zur Sirupdicke eingedampft, dann an der Luft stehen gelassen, wobei sich

allmählich körnige Kristalle bilden, die Citronensäure sind“. Die Kohlenwasserstoffbestimmung gab gut auf Citronensäure stimmende Werte. Die wässrige Lösung der Säure gab mit Silbernitratlösung keinen Niederschlag, auf Zusatz von Ammoniak entstand eine weiße Fällung. Kalkwasser gab in der Kälte keinen Niederschlag und verdünnte Chlorcalciumlösung ebenfalls nicht; nach dem Neutralisieren mit Ammoniak entstand aber beim Kochen ein reichlicher Niederschlag von citronensaurem Kalk.

Es dürfte sicher sein, daß in den Krappwurzeln Citronensäure enthalten ist.

Ludwig Haitinger (Monatsh. f. Chem. 2, 485, 1881) untersucht die von O. Lietzenmayer (Diss. Erlangen, 1878) aus Schöllkraut, Chelidonium majus, erhaltene isomere Äpfelsäure. Der mit Salpetersäure angesäuerte Krautsaft wurde mit Bleinitrat gefällt. Der Niederschlag enthält alle Chelidonsäure und einen Teil der isomeren Äpfelsäure. Der Bleiniederschlag wurde mit Calciumhydrosulfid zersetzt und unter Zusatz von etwas Salzsäure die Lösung der Calciumsalze bis zum Auskristallisieren des Calciumchelidonats eingedampft. Die Mutterlaugen von diesem gaben nach der Neutralisation mit Kalkwasser den gesuchten „äpfelsauren Kalk“. Eine zweite Portion „äpfelsauren Kalk“ erhält man durch Neutralisation des Filtrats vom Bleiniederschlag mit Natronlauge, Zusatz von Bleinitrat und Zersetzen der Fällung mit Calciumhydrosulfid. Die vereinten Kalksalze wurden in verdünnter Salpetersäure gelöst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt und mit Soda zerlegt. Das Natriumsalz wurde in das Bleisalz umgewandelt und dieses mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Durch Eindampfen des Filtrats vom Schwefelblei auf dem Wasserbade wurden große wasserhelle Kristalle erhalten, die durch mehrmaliges Umlösen aus heißem Wasser von anwesender Phosphorsäure gereinigt wurden. Der Schmelzpunkt der reinen Kristalle war 150 bis 152°. Die Kristalle sind nach der Elementaranalyse der freien Säure und des Ammoniumsalzes, der Kristallmessung und nicht näher angegebenen Reaktionen Citronensäure.

Es ist sicher, daß im Schöllkraut Citronensäure enthalten ist.

H. Ritthausen [Journ. f. prakt. Chem. (2) 29, 357, 1884] zog die gepulverten Samen der Erbse, Pisum sativum, der Wicke, Vicia sativa, der Saubohne, Vicia Faba, und der weißen Gartenbohne, Phaseolus vulgaris, mit Wasser unter Zusatz von wenig Salzsäure aus, neutralisierte den Auszug mit Kalilauge, engte stark ein und fällte mit Bleiacetat. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Bleisulfid mit Kalkmilch stark alkalisch gemacht und der größtenteils aus phosphorsaurem Kalk bestehende Niederschlag abfiltriert. Durch Kochen des Filtrats wurde ein beträchtlicher Niederschlag erhalten, der heiß abfiltriert wurde. Das Kalksalz wurde mit der berechneten Menge Schwefelsäure zerlegt und das Filtrat vom Gips eingeeengt; nach kurzem Stehen über Schwefelsäure kristallisierte „die Säure in großen, für die Citronensäure charakteristischen Kristallen aus“. Die kristallisierte Säure wurde in Wasser gelöst und kochend durch Zusatz von Ammoniak und Calciumchlorid zitronensaurer Kalk gefällt, der an der Luft getrocknet wurde. Calcium- und Wasserbestimmungen gaben gut auf zitronensauren Kalk + 4 Wasser stimmende Werte. Von der Säure aus den weißen Gartenbohnen liegen keine Analysen vor.

Nach den Angaben ist es sicher, daß in den Erbsen, der Wicke und der Saubohne Citronensäure enthalten ist.

Hartwig Franzen und Eugen Schuhmacher (Zeitschr. f. physiol. Chem. 115, 9, 1921) fällten Johannisbeersaft, *Ribes rubrum*, mit Bleiacetat, zersetzten den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, dampften das Filtrat vom Bleisulfid ein, veresterten die Säuren und unterwarfen die Ester der gebrochenen Destillation. Die bei 169 bis 170° 14 mm siedende Fraktion gab bei der Elementaranalyse gut auf Citronensäuretriäthylester stimmende Werte. Die aus dem Ester erhaltene Benzylidenverbindung des Hydrazids gab gut auf Tribenzylidencitronensäuretrihydrazid stimmende Stickstoffwerte.

Es ist sicher, daß in den Johannisbeeren Citronensäure enthalten ist.

Hartwig Franzen und Fritz Helwert (Zeitschr. f. physiol. Chem. 121, 46, 1922) fällten Kirschsaft, *Prunus avium*, mit Bleiacetat, zerlegten den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, dampften das Filtrat vom Bleisulfid ein, veresterten die Säuren und unterwarfen die Ester der gebrochenen Destillation. Aus den höher siedenden Fraktionen ließ sich über das Hydrazid Tribenzylidencitronensäuretrihydrazid, welches den richtigen Schmelzpunkt zeigte und gut stimmende Stickstoffwerte gab, gewinnen.

Es ist sicher, daß in den Kirschen Citronensäure enthalten ist.

Edmund O. v. Lippmann (Ber. 55, 3038, 1922) konnte aus Vogelbeersaft, *Pirus Aucuparia*, das Calciumsalz der Citronensäure (wie, ist nicht angegeben) abscheiden. Die Kristallwasser- und Calciumbestimmung des Salzes gaben gut stimmende Werte und ebenfalls die Kristallwasserbestimmung der freien Säure. Die wasserhaltige Säure schmolz bei 100° und die wasserfreie bei 155°.

Es dürfte kein Zweifel bestehen, daß in den Vogelbeeren Citronensäure enthalten ist.

Literatur, die uns nicht zugänglich war.

1. *Ann. de chim. analytique appliqué a l'industrie* 6, 85, 1901, Truchon; C. 1901 (1), S. 964; 13, 139, 1908, Hubert; C. 1908 (1), S. 1901; 13, 177, 1908, Favrel; C. 1908 (2), S. 350; 13, 224, 1908, Astruc; C. 1908 (2), S. 432. —
2. *Boll. chim. farm.* 50, 573, 1911, Ricardelli; C. 1911 (2), S. 1054. — 3. *Journ. of Ind. and Eng. Chem.* 10, 30, 1918, Daughters; C. 1918 (2), S. 377. —
4. *Pharmaceutisch Weekblad* 56, 1047, 1919, Brocksmit; C. 1919 (4), S. 895. —
5. *Stazione sperimentali agrarie italiane* 47, 431, 1914, Lopriore; C. 1914 (2), S. 259. — 6. *Zeitschr. d. allgem. österr. Apothekerver.* 43, 749, 1905, Kunz; C. 1905 (2), S. 791; 1879, S. 361, Peckolt; 1886, S. 1, Peckolt. — 7. *L'Orosi Giorn. di chim., farm. e scienc. affini* 11, 263, 1888, Campani. — 8. *Bull. Soc. Ph. de Bordeaux* 1898, S. 33, Deniges; C. 1898 (2), S. 134. — 9. *Amer. Journ. of Pharm.* 23, 165, Plummer; 31, 198, Lancaster; 1886, S. 417, Rosenbaum; 67, 387, 1895, Sayne. — 10. *Ann. Chim. Pharm.* 72, 428, 1859, Bracconot. — 11. *Arch. farm. sper.* 24, 345, 1917, Sellimy. — 12. *Chem. and Drog.* 1885, S. 313, Remnie. — 13. *Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Pharm.* 4, 1, 1841, Walz; 5, 284, 1842, Walz; 6, 10, 1843, Walz. — 14. *Journ. d. Pharm. von Trommsdorff* 11, 194, Pfaff; 1880, S. 68, Ferdinand. — 15. *Nouvell Remed.* 1885, S. 195. — 16. *Pharmacogr. ind.* 2, 358, Dymock. — 17. *Pharm. Zeitschr. f. Rußland* 23, 590, 1883, Schiperowitsch. — 18. *Repert. chim. appl. pur.* 11, 72, 1860, Fromberg. — 19. *Riv. chim. med. farm.* 2, 384, 1884, Negri. — 20. *Thoms Ann.* 7, 247, Henderson; 5, 109, Proust. — 21. *Weender Jahresber.* 2, 21, 1855/56, Moser.

Zusammenfassung.

Bei einer kritischen Durchsicht der Literatur zeigt sich, daß die allgemein verbreitete Ansicht, Citronensäure sei als ein im Pflanzenreich weit verbreiteter Körper nachgewiesen, nicht haltbar ist. Wahrscheinlich ist Citronensäure nachgewiesen in folgenden Pflanzen: 1. Tabak, *Nicotiana Tabacum* (Blätter), 2. Maulbeere, *Morus nigra* (unreife Beere), 3. Affenbrotbaum, *Adansonia digitata* (Frucht), und sicher in den folgenden: 1. Apfelbaum, *Pirus malus* (Stammrinde), 2. *Richardsonia scabra* (Kraut und Wurzel), 3. Weinrebe, *Vitis vinifera* (Blutungssaft), 4. Sauerkirsche, *Prunus cerasus* (Blätter), 5. Lupinensamen, 6. Zuckerrohr, *Saccharum officinarum* (Saft des Rohres), 7. Moosbeere, *Vaccinium oxycoccos* (Frucht), 8. Krapp, *Rubia tinctorum* (Wurzel), 9. Schöllkraut, *Chelidonium majus* (Kraut), 10. Erbse, *Pisum sativum* (Samen), 11. Wicke, *Vicia sativa* (Samen), 12. Saubohne, *Vicia faba* (Samen), 13. Vogelbeere, *Pirus Aucuparia* (Beeren), 14. Citrone, *Citrus Aurantium* (Frucht), 15. Johannisbeeren, *Ribes rubrum* (Beeren), 16. Kirsche, *Prunus avium*, (Frucht).

Über die Reaktion von Antigen und Antikörper nach Bindung des einen von ihnen an Kohle.

Von
M. Eisler.

(Aus dem staatlichen sero-therapeutischen Institut in Wien.)

(Eingegangen am 13. November 1922.)

Die Art der Verbindung zwischen Antigen und Antikörper bedarf trotz des großen experimentellen Tatsachenmaterials, welches darüber vorliegt und der daraus abgeleiteten Theorien, noch einer weiteren Klärung. Es wäre zwecklos, auf diese letzteren hier wieder näher einzugehen; immerhin aber läßt sich schon mit Rücksicht auf die kolloidale Natur der in Betracht kommenden Körper mit einiger Sicherheit annehmen, daß wenigstens für den Eintritt der Bindung von Antigen und Antikörper, an die sich, wie wir wissen, noch weitere Prozesse anschließen, physikalische Vorgänge von großer Bedeutung sind. Nach dieser Auffassung und den experimentellen Ergebnissen, wäre es wohl berechtigt, die Vereinigung von Antigen und Antikörper als Adsorptionsvorgang anzusehen. Aber auch durch diese Auffassung ist der Charakter des Bindungsvorganges nicht eindeutig festgelegt, weil der Begriff der Adsorption auch in der Kolloidchemie, der wir die physikalisch-chemische Betrachtungsweise in der Immunitätsforschung verdanken, noch nicht fest abgegrenzt ist. Wurde doch für diesen Vorgang eine Reihe von empirischen Formeln mit verschiedenen Konstanten aufgestellt und die Möglichkeit einen Prozeß durch eine solche Formel auszudrücken, oft als genügender Beweis angesehen, um ihn als Adsorption anzusprechen. Die Erkenntnis, daß es im einzelnen Falle auf Grund der Adsorptionsisotherme nicht möglich ist, zu entscheiden, ob eine typische Adsorption, also eine reine Oberflächenwirkung, oder eine Absorption, also ein Lösungsvorgang, oder endlich ein chemischer Prozeß vorliegt, hat zu dem Vorschlag geführt (*Mc Bain*), von *Sorption* schlechtweg zu sprechen.

Wenn es demnach auch für die Immunitätsforschung derzeit wenig aussichtsvoll erscheint, sich mit derartigen theoretischen Problemen zu befassen, schien es mir andererseits doch möglich, durch

die Untersuchung des Verhaltens von Antigen und Antikörper zueinander, wenn eine der beiden Komponenten an eine Adsorbens gebunden ist, Aufschlüsse in mehrfacher Richtung zu erhalten. Nicht nur über die Reaktionsweise der beiden Körper, sondern auch über ihre Beschaffenheit dürften sich aus solchen Versuchen gewisse Schlüsse ziehen lassen, und auch noch ein anderes interessantes Phänomen der Immunitätsforschung, nämlich der durch Zusatz von spezifischem Präcipitin zu einem Immunserum verursachte Antikörperverlust, der mit der Reaktion zwischen Antigen und Antikörper in innigem Zusammenhange steht, schien auf diesem Wege einer weiteren Aufklärung zugänglich.

Durch die Versuche von *Dehne* und *Hamburger* (1), *Kraus* und *Pribram* (2), *Eisler* und *Tsuru* (3), *Landsteiner* und *Prasek* (4), sowie von *Eisler* (5) wurden nicht nur die näheren Bedingungen dieser Verluste erforscht, sondern auch die nahen Beziehungen zwischen Antikörper und Präcipitinogen festgestellt. Für die vorliegenden Untersuchungen ist es wichtig, auf zwei Tatsachen besonders hinzuweisen. Erstens auf die Feststellung von *Kraus* und *Pribram* (2), daß schon die Bindung des Präcipitins, ohne daß Fällung erfolgt, einen Schwund des Antikörpers bewirkt, zweitens auf den von *mir* (5) erhobenen Befund, daß das Antitoxin, auch wenn es bereits Toxin gebunden hat, noch immer der Präcipitinwirkung zugänglich ist. Aus den Versuchen ist zu schließen, daß bestimmte, durch die Anlagerung des Präcipitins hervorgerufene Veränderungen der antikörperhaltigen Eiweißteilchen im Sinne ihrer Dispersitätsverminderung und die durch diese letztere bedingten Folgen, namentlich bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit, imstande sind, die beobachteten Verluste der Agglutinine und Antitoxine zu bewirken.

Auf Grund dieser Überlegungen habe ich zunächst geprüft, in welcher Weise die Kohle, welche als typisches Adsorbens gilt, das von ihr gebundene Serumeiweiß bezüglich seiner Antikörperfunktion beeinflusst. Die vorliegende Versuchsreihe bezieht sich auf Antitoxine, und zwar auf ein gegen das Hämotoxin von Vibrionen gerichtetes, ferner auf Tetanus- und Diphtherieantitoxin, die alle vom Pferde stammten. Außer diesen Antitoxinen wurden in jedem Falle auch die Eigenschaften der dazugehörigen, an Kohle fixierten Toxine untersucht, um auf diese Weise auch über die Beeinflussung der zweiten an der Reaktion beteiligten Komponente Aufschluß zu erhalten. Da man nach den oben angeführten Versuchen berechtigt ist, das Präcipitinogen als den Träger der Antikörperfunktion anzusehen, wurde auch noch geprüft, ob das an Kohle gebundene Pferdeserum mit Präcipitin zu reagieren vermag, und ob diese Verbindung auch zur Komplementbindung fähig ist.

1. *Vibrio*-Hämotoxin und Antitoxin.

Zu diesen und auch zu allen folgenden Versuchen wurde ein Präparat aus Knochenkohle, dessen Herkunft unbekannt war, verwendet. Das Hämotoxin gewann ich durch Filtration einer zehntägigen Bouillonkultur des *Vibrio Kadikjö*¹⁾. Die lösende Dosis eines solchen Filtrats, dem zur Verhinderung von Bakterienwachstum etwas Thymol zugefügt wurde, betrug 0,01 bis 0,02 ccm für 1 ccm 5proz. Kaninchenblutaufschwemmung. Von dem benutzten Antitoxin, einem mehrere Jahre alten Pferdeimmunserum, genügten 0,0005 bis 0,0007 ccm zur Neutralisation obiger Toxinmenge, wenn beide vor dem Blutzusatz $\frac{1}{2}$ Stunde bei 36° C digeriert wurden.

Zunächst soll durch je ein Versuchsbeispiel die Bindungsfähigkeit der Kohle für das Toxin und Antitoxin veranschaulicht werden. Die Versuchsanordnung war folgende: Zum Nachweis der Toxinbindung wurde je 0,1 g Kohle mit verschiedenen Mengen des Bouillongiftes versetzt, das Volumen mit 0,85proz. Kochsalzlösung immer auf 2 ccm aufgefüllt, und die Proben unter mehrmaligem Umschütteln $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen scharf zentrifugiert, die vollkommen klare, von Kohlenteilchen freie Flüssigkeit abgegossen, das Kohlensediment wieder in 2 ccm Kochsalzlösung aufgenommen. Zu der Kohlenaufschwemmung und zu abgemessenen Mengen des Abgusses wurde behufs Prüfung des Hämotoxingehaltes je 1 ccm 5proz. Kaninchenblutaufschwemmung zugesetzt. In ganz gleicher Weise wurde auch beim Antitoxin-Bindungsversuch vorgegangen, bei welchem die Prüfung des Kohlensediments entfiel, und die Menge des adsorbierten Antikörpers durch Auswertung der abgegossenen Flüssigkeit berechnet wurde. Diese geschah in der Weise, daß abgemessene Mengen des Abgusses mit je einer komplettlösenden Giftdosis $\frac{1}{2}$ Stunde bei 36° C digeriert und hierauf mit je 1 ccm Kaninchenblutaufschwemmung versetzt wurden.

Es werden also bei Zimmertemperatur innerhalb $\frac{1}{2}$ Stunde von 0,1 g Kohle 50 lösende Dosen entsprechend 0,5 ccm Bouillon so gut wie vollständig gebunden, da selbst vier Fünftel der überstehenden Flüssigkeit erst nach längerer Zeit ganz schwache Lösung des Blutes bewirken. Von geringeren Toxinmengen bleibt überhaupt nichts im Abgusse zurück. Andererseits gibt die Kohle von dem gebundenen Hämolysin einen Teil an zugesetztes Blut ab; dieser Anteil wächst mit zunehmender Bindungsgröße und erreicht bei 50 Dosen ungefähr eine komplett lösende Einheit. In andern derartigen Versuchen wurde die Toxinabgabe der Kohle genauer ausgewertet und festgestellt, daß

¹⁾ Siehe O. Loewy, Zentralbl. f. Bakteriол., Abt. I, Orig.-Bd. 75, 1914.

Tabelle I.
Bindung von Hämotoxin durch Kohle.

Menge des Toxins	Menge des Abgusses	Menge der Sediment- aufschwemmung	Resultat nach	
			1 h, 36° C	3 h, Zimmer- temperatur
10 Dosen = 0,1 ccm	— 1,6 ccm 0,4 ccm	2 ccm — —	ungelöst " "	Spur gelöst ungelöst "
20 Dosen = 0,2 ccm	— 1,6 ccm 0,3 ccm	2 ccm — —	ungelöst " "	part. gelöst ungelöst "
50 Dosen = 0,5 ccm	— 1,6 ccm 0,3 ccm	2 ccm — —	Spur gelöst ungelöst "	kompl. gel. Spur gelöst ungelöst

1 und selbst noch 0,3 ccm der Sedimentaufschwemmung das zugesetzte Blut vollständig lösten, also ungefähr sechs lösende Dosen abgegeben wurden. Hervorzuheben wäre noch, daß das gebundene Gift trotz der lösenden Fähigkeit der Sedimente an der Kohle festhaftet. Vergleichende Versuche haben nämlich gezeigt, daß die nach der Toxinbindung noch einmal mit Kochsalzlösung gewaschene Kohle genau so stark hämolytisch wirkt wie die nichtgewaschene.

In der folgenden Tabelle II sind einige Versuche über das Antitoxinbindungsvermögen der Kohle aus Pferdeserum zusammengestellt.

Tabelle II.
Bindung von Antihämotoxin durch Kohle.

Menge des Antitoxins	Menge des Abgusses ccm	Resultat nach		Bindung in Prozenten
		1 h, 36° C	3 h, Zimmer- temperatur	
0,005 ccm = 10 Anti- toxindosen	1,5 0,4	Spur gelöst part. gelöst	part. gelöst kompl. gel.	90
0,025 ccm = 50 Anti- toxindosen	1,4 0,3	ungelöst Spur "gelöst	ungelöst stark "gelöst	80
0,035 ccm	0,1 0,05 0,03 0,01	ungelöst Spur gelöst part. gelöst kompl. gel.	ungelöst ? part. gelöst kompl. gel. "	60
0,1 ccm = 100 Anti- toxindosen	0,05 0,02 0,01 0,005	ungelöst — part. gelöst stark gelöst		50

Auch vom Antihämotoxin werden unter den angegebenen Versuchsbedingungen beträchtliche Mengen der Flüssigkeit entzogen, wobei die relative Bindungsstärke bei höheren Konzentrationen abnimmt, eine bei solchen Prozessen wohlbekannte Erscheinung.

Über die Bindung verschiedener Antikörper aus Serum durch anorganische und organische Substanzen — darunter auch durch Kohle — liegt eine Reihe von Beobachtungen vor. Sie haben erkennen lassen, wie kompliziert und variabel die diesen Prozessen zugrunde liegenden Verhältnisse sind. Abgesehen davon, daß, wie ja zu erwarten ist, die Ergebnisse je nach der Art des Sorbens variieren, hat sich gezeigt, daß selbst dasselbe Sorbens — in unserem Falle die Kohle — in Versuchen von *Zunz* (6) aus Pferdeserum zwar Tetanus, nicht aber Diphtherieantitoxin bindet. Eigene Versuche zusammen mit *Tsuru* (3) zeigten, daß sogar derselbe Antikörper, nämlich das Antilysin gegen *Vibrio*-Hämotoxin aus zwei annähernd gleich hochwertigen und gleich alten Pferdesera von Kohle in sehr ungleichem Maße adsorbiert wird. Außer der Stärke ist auch die Festigkeit der erzielten Bindung in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Bei einer Anzahl von Sorbentien, die Agglutinine verschiedener Herkunft aufgenommen hatten, wurden Untersuchungen auch in dieser Richtung gemacht. Nicht nur durch Säure und Alkali (*Hahn* und *Trommsdorf*) (7) sondern sogar schon durch mäßiges Erwärmen bei neutraler Reaktion, lassen sich solche Verbindungen, wie *Landsteiner* (8) und seine Mitarbeiter nachgewiesen haben, teilweise zerlegen.

Mit Rücksicht auf diese Befunde habe ich geprüft, ob die Kohle unter verschiedenen Bedingungen einen Teil des gebundenen Hämotoxins oder Antilysins abgibt. Durch einfaches Waschen der toxinbeladenen Kohle mit Kochsalzlösung, konnten aus dieser, wie bereits erwähnt wurde, keine nachweisbaren Giftmengen erhalten werden, wohl aber gab sie an rote Blutkörperchen zu deren Lyse hinreichende Quantitäten ab (Tabelle I). In den nachfolgenden Versuchen wurden je 0,1 g Kohle mit bestimmten Mengen Toxin oder Antitoxin $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, hierauf scharf zentrifugiert, zur Entfernung eventuell noch vorhandener ungebundener Reste mit Kochsalzlösung gewaschen, schließlich teils in Kochsalzlösung, teils in verdünntem oder konzentriertem, normalem Pferdeserum aufgeschwemmt und bei verschiedenen Temperaturen digeriert. Die durch Abzentrifugieren der Kohle gewonnenen klaren Flüssigkeiten und nötigenfalls auch die Sedimente wurden in der üblichen Weise untersucht.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen gab die Kohle somit weder an Kochsalzlösung noch an verdünntes normales Pferdeserum Toxin ab; Antitoxin ließ sich in Kochsalzlösung ebenfalls nicht nachweisen, bei Digestion aus konzentriertem Pferdeserum nur in Spuren, insofern gewisse Mengen desselben die Hämolyse stärker hemmten als die entsprechenden Dosen von nicht digeriertem Normalserum. Aus den angeführten Versuchen mit Toxin läßt sich aber auch ent-

Tabelle III.

Festigkeit der Bindung von Toxin und Antitoxin an Kohle.

e und Art Ansatzes	Stärke der Bindung	Temp. der Di- gestion	Di- gestions- zeit	Digestions- flüssigkeit	Resultat für		
					Antitoxin, Abguß	Toxin, Abguß	Toxin, Sediment
35 ccm munser.	60 proz.	5° C 40	1 Std. "	Kochsalz- lösung	Keine Hem- mung d. Lyse dasselbe	—	—
25 ccm munser.	80 proz.	50	1/4 Std.	konz. Pferde- serum	Ger. Hem- mung d. Lyse	—	—
5 ccm Toxin	Kompl.	5 40	1 Std. "	Kochsalzlös. "	—	Keine Lyse	0 ccm part. gel. 2 ccm ungelöst
5 ccm Toxin	Kompl.	5 40	" "	Pferdeserum 30 fach verd. "	—	"	0,3 ccm kompl. gel. 0,1 ccm " " 0,05 ccm stark gel. 0,3 ccm kompl. gel. 0,1 ccm part. gel. 0,05 ccm Spur gel.
5 ccm Toxin	Fast kompl.	20	1/2 Std.	Kochsalzlös.	—	Spur gel.	0,5 ccm kompl. gel. 0,3 ccm " " 0,1 ccm stark gel. 0,05 ccm part. gel.

nehmen, daß die Größe der Bindung, besonders aber ihre Festigkeit sowohl mit der Zeit als auch der höheren Temperatur zunimmt. Denn während nach halbstündiger Bindung bei 20° C der Abguß noch spurenweise löst und noch 0,3 ccm der Sedimentaufschwemmung komplette Lyse bewirken, sind die abgegossenen Flüssigkeiten, wenn die Kohle noch 1 Stunde, sei es bei 5 oder 40° C, mit der Giftlösung in Berührung war, vollkommen unwirksam; das in der Kälte gehaltene Kohlsediment löst selbst in der Menge von 2 ccm das zugesetzte Blut nicht mehr vollständig, das in der Wärme gehaltene aber überhaupt nicht mehr. Die festere Bindung bei höherer Temperatur ist auch bei der Digestion der Kohle mit verdünntem Pferdeserum aus der Tabelle III zu ersehen. Übrigens ist dieses, obwohl auch bei einer solchen Versuchsanordnung in der abgegossenen Flüssigkeit keine Spur von Lysin nachweisbar ist, nicht ohne Einfluß auf die Stabilität der Kohlen-Toxinbindung, wie sich aus dem Verhalten der Sedimente ergibt. Letztere lösen nämlich ungefähr ebenso stark wie die Proben mit nur 1/2 Stunde und viel stärker als die mit der gleichen Bindungszeit in Kochsalzlösung. Offenbar findet durch die gleichzeitige Adsorption von Pferdeserum an die toxinbeladene Kohle eine gewisse Verdrängung desselben oder richtiger eine Lockerung in der Festigkeit der Bindung statt, so daß wieder eine bestimmte Menge an Blut abgegeben wird.

Nachdem die angeführten Versuchsbeispiele über die Größe und Festigkeit der Adsorption von Toxin und Antitoxin einigen Aufschluß

Über die Bindung verschiedener Antikörper aus Serum durch anorganische und organische Substanzen — darunter auch durch Kohle — liegt eine Reihe von Beobachtungen vor. Sie haben erkennen lassen, wie kompliziert und variabel die diesen Prozessen zugrunde liegenden Verhältnisse sind. Abgesehen davon, daß, wie ja zu erwarten ist, die Ergebnisse je nach der Art des Sorbens variieren, hat sich gezeigt, daß selbst dasselbe Sorbens — in unserem Falle die Kohle — in Versuchen von *Zunz* (6) aus Pferdeserum zwar Tetanus, nicht aber Diphtherieantitoxin bindet. Eigene Versuche zusammen mit *Tsuru* (3) zeigten, daß sogar derselbe Antikörper, nämlich das Antilysin gegen *Vibrio-Hämotoxin* aus zwei annähernd gleich hochwertigen und gleich alten Pferdesera von Kohle in sehr ungleichem Maße adsorbiert wird. Außer der Stärke ist auch die Festigkeit der erzielten Bindung in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Bei einer Anzahl von Sorbentien, die Agglutinine verschiedener Herkunft aufgenommen hatten, wurden Untersuchungen auch in dieser Richtung gemacht. Nicht nur durch Säure und Alkali (*Hahn* und *Trommsdorf*) (7) sondern sogar schon durch mäßiges Erwärmen bei neutraler Reaktion, lassen sich solche Verbindungen, wie *Landsteiner* (8) und seine Mitarbeiter nachgewiesen haben, teilweise zerlegen.

Mit Rücksicht auf diese Befunde habe ich geprüft, ob die Kohle unter verschiedenen Bedingungen einen Teil des gebundenen Hämotoxins oder Antilysin abgibt. Durch einfaches Waschen der toxinbeladenen Kohle mit Kochsalzlösung, konnten aus dieser, wie bereits erwähnt wurde, keine nachweisbaren Giftmengen erhalten werden, wohl aber gab sie an rote Blutkörperchen zu deren Lyse hinreichende Quantitäten ab (Tabelle I). In den nachfolgenden Versuchen wurden je 0,1 g Kohle mit bestimmten Mengen Toxin oder Antitoxin $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, hierauf scharf zentrifugiert, zur Entfernung eventuell noch vorhandener ungebundener Reste mit Kochsalzlösung gewaschen, schließlich teils in Kochsalzlösung, teils in verdünntem oder konzentriertem, normalem Pferdeserum aufgeschwemmt und bei verschiedenen Temperaturen digeriert. Die durch Abzentrifugieren der Kohle gewonnenen klaren Flüssigkeiten und nötigenfalls auch die Sedimente wurden in der üblichen Weise untersucht.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen gab die Kohle somit weder an Kochsalzlösung noch an verdünntes normales Pferdeserum Toxin ab; Antitoxin ließ sich in Kochsalzlösung ebenfalls nicht nachweisen, bei Digestion aus konzentriertem Pferdeserum nur in Spuren, insofern gewisse Mengen desselben die Hämolyse stärker hemmten als die entsprechenden Dosen von nicht digeriertem Normalserum. Aus den angeführten Versuchen mit Toxin läßt sich aber auch ent-

Tabelle III.

Festigkeit der Bindung von Toxin und Antitoxin an Kohle.

Menge und Art Ansatzes	Stärke der Bindung	Temp. der Digestion	Digestionszeit	Digestionsflüssigkeit	Antitoxin, Abguß	Resultat für	
						Toxin, Abguß	Toxin, Sediment
15 ccm nunser.	60 proz.	5° C 40	1 Std. "	Kochsalz- lösung	Keine Hem- mung d. Lyse desselbe	— —	— —
25 ccm nunser.	80 proz.	50	1/4 Std.	konz. Pferde- serum	Ger. Hem- mung d. Lyse	—	—
5 ccm Toxin	Kompl.	5 40	1 Std. "	Kochsalzlös. "	— "	Keine Lyse "	0 ccm part. gel. 2 ccm ungelöst
5 ccm Toxin	Kompl.	5 40	" "	Pferdeserum 30 fach verd. "	— "	" "	0,3 ccm kompl. gel. 0,1 ccm " 0,05 ccm stark gel. 0,3 ccm kompl. gel. 0,1 ccm part. gel. 0,05 ccm Spur gel.
5 ccm Toxin	Fast kompl.	20	1 1/2 Std.	Kochsalzlös.	—	Spur gel.	0,5 ccm kompl. gel. 0,3 ccm " 0,1 ccm stark gel. 0,05 ccm part. gel.

nehmen, daß die Größe der Bindung, besonders aber ihre Festigkeit sowohl mit der Zeit als auch der höheren Temperatur zunimmt. Denn während nach halbstündiger Bindung bei 20° C der Abguß noch spurenweise löst und noch 0,3 ccm der Sedimentaufschwemmung komplette Lyse bewirken, sind die abgegossenen Flüssigkeiten, wenn die Kohle noch 1 Stunde, sei es bei 5 oder 40° C, mit der Giftlösung in Berührung war, vollkommen unwirksam; das in der Kälte gehaltene Kohlensediment löst selbst in der Menge von 2 ccm das zugesetzte Blut nicht mehr vollständig, das in der Wärme gehaltene aber überhaupt nicht mehr. Die festere Bindung bei höherer Temperatur ist auch bei der Digestion der Kohle mit verdünntem Pferdeserum aus der Tabelle III zu ersehen. Übrigens ist dieses, obwohl auch bei einer solchen Versuchsanordnung in der abgegossenen Flüssigkeit keine Spur von Lysin nachweisbar ist, nicht ohne Einfluß auf die Stabilität der Kohlen-Toxinbindung, wie sich aus dem Verhalten der Sedimente ergibt. Letztere lösen nämlich ungefähr ebenso stark wie die Proben mit nur 1/2 Stunde und viel stärker als die mit der gleichen Bindungszeit in Kochsalzlösung. Offenbar findet durch die gleichzeitige Adsorption von Pferdeserum an die toxinbeladene Kohle eine gewisse Verdrängung desselben oder richtiger eine Lockerung in der Festigkeit der Bindung statt, so daß wieder eine bestimmte Menge an Blut abgegeben wird.

Nachdem die angeführten Versuchsbeispiele über die Größe und Festigkeit der Adsorption von Toxin und Antitoxin einigen Aufschluß

gegeben haben, wäre noch einiges über das Verhältnis der Bindung von Eiweiß bzw. stickstoffhaltiger Körper und Toxin oder Antitoxin zu sagen. Wird 0,1 g mit 0,5 ccm Bouillonfiltrat von *Vibrio Kadikjö* in der beschriebenen Weise behandelt, so wissen wir, daß in der durch Zentrifugieren gewonnenen überstehenden Flüssigkeit nur mehr Spuren von Hämolsin nachweisbar sind, daß somit die zugesetzte Toxinmenge so gut wie vollständig von der Kohle gebunden wurde. Gleichzeitig mit einem derartigen Versuche wurde der N-Gehalt nach *Kjeldahl* (Mikromethode von *Bang*) bestimmt, und zwar in 0,5 ccm des toxischen Bouillonfiltrats vor dem Zusatze der Kohle und im Abgusse nach erfolgter Adsorption. Die betreffenden Werte betragen 0,5459 mg für das erstere und 0,3730 mg für den letzteren. Es wurden somit nur 0,1729 mg N gebunden gegenüber dem gesamten Toxin. Dieses kann also, selbst wenn wir den gesamten gebundenen N für das Hämolsin in Anspruch nehmen, nur 0,0034 mg pro lösender Dosis enthalten. Der übrige Stickstoff in dem Bouillonfiltrat könnte teils von Extraktivstoffen, teils von Aminosäuren herrühren, welche bei Anwesenheit höher zusammengesetzter N-haltiger Körper von Kohle nicht oder nur in sehr geringem Maße adsorbiert werden¹⁾. Über diese Verhältnisse müssen erst weitere Versuche Aufschluß geben.

Aus 0,035 ccm des antihämotoxischen Serums werden, wie aus den angeführten Versuchen hervorgeht, von 0,1 g Kohle 50 bis 60 % des Immunkörpers gebunden. Die N-Zahlen für diese Serummenge und den durch Zentrifugieren erhaltenen Abguß waren 0,3752 mg und 0,2548 mg, mithin ein Verlust von 0,1204 mg, das wären etwa 30 %. Es wird also bedeutend mehr Antitoxin als Eiweiß gebunden. Bei der Bewertung dieses Befundes muß man berücksichtigen, daß das Serum außer dem antitoxinhaltigen Globulin auch Albumin enthält, welches, wie aus Untersuchungen von *Landsteiner* und *Uhlicz* (10) hervorgeht, in wesentlich geringerem Maße von Adsorbentien aufgenommen wird als die leichter fällbaren Globuline. Dieser Umstand dürfte zur Aufklärung der beobachteten Differenz zwischen Eiweiß- und Antitoxinadsorption von Bedeutung sein. Die Versuche, in denen statt des Vollserums entsprechende Mengen des durch Ammonsulfatfällung gewonnenen und dialysierten Globulins verwendet wurden, ergaben neben einem etwa 50proz. Antitoxinverlust auch einen fast ebenso großen des Globulins, also eine befriedigende Übereinstimmung beider. Die in derartigen Versuchen gewonnenen Zahlen können aus verschiedenen Gründen, namentlich schon wegen der nicht unbeträchtlichen Fehler bei der Mikrokjeldahl-Bestimmung keinen Anspruch auf Genauigkeit machen und nur zu einer ungefähren Schätzung dienen.

¹⁾ Vgl. *Abderhalden* und *Födor* (9).

Tabelle IV.

Verhalten der mit Immun- bzw. Normalserum beladenen Kohle zu Toxin.

Menge und Art des zugeetzten Serums	Menge des zu- gesetzten Toxins	Menge des Abgusses ccm	Menge des Sediments ccm	Resultat nach	
				1 h, 36° C	3 h, Zimmer- temperatur
0,004 ccm Immunserum	0,1 ccm = 10 Dosen	1,5	—	ungelöst	ungelöst
		0,4	—	"	kompl. gel.
		1,5	2	ungelöst	ungelöst
0,004 ccm Normalserum	Dasselbe	0,4	—	"	kompl. gel.
		—	2	"	kompl. gel.
		1,6	—	part. gel.	kompl. gel.
0,01 ccm Immunserum	0,2 ccm = 20 Dosen	0,3	—	ungelöst	Spur gel.
		—	2	part. gel.	kompl. gel.
		1,6	—	"	"
0,01 ccm Normalserum	Dasselbe	0,3	—	ungelöst	Spur gel.
		—	2	part. gel.	kompl. gel.
		1,6	—	ungelöst	ungelöst
—	Dasselbe	0,3	—	"	"
		—	2	"	part. gel.
		1,6	—	kompl. gel.	kompl. gel.
0,1 ccm Immunserum	0,5 ccm = 50 Dosen	0,3	—	part. gel.	"
		—	1,7	kompl. gel.	"
		—	0,3	"	"
0,025 ccm Immunserum	Dasselbe	1,6	—	f. kompl. gel.	"
		0,3	—	Spur gel.	stark gel.
		—	1,7	kompl. gel.	kompl. gel.
0,025 ccm Normalserum	Dasselbe	1,6	—	f. kompl. gel.	"
		0,3	—	Spur gel.	f. kompl. gel.
		—	1,7	kompl. gel.	kompl. gel.
—	Dasselbe	1,6	—	ungelöst	Spur gel.
		0,3	—	"	ungelöst
		—	1,7	"	kompl. gel.
0,1 ccm Immunserum	0,03 ccm = 3 Dosen	—	0,3	"	f. kompl. gel.
		2	—	ungelöst	ungelöst ¹⁾
		—	1	"	stark gel.
0,1 ccm Normalserum	Dasselbe	2	0,5	"	part. gel.
		—	—	"	Spuren gel.
		—	1	"	f. kompl. gel.
—	Dasselbe	—	0,5	"	stark gel.
		2	—	"	ungelöst
		—	2	"	"

Übrigens ließ sich auch noch auf andere Weise zeigen, daß vom Globulin durch die Kohle mehr adsorbiert wird als vom Albumin. Verdünnt man nämlich das Vollserum so weit, daß es die gleiche antihämotoxische Wirkung hat, wie der nach der Kohlenadsorption erhaltene Abguß, und sättigt verschiedene Mengen dieser beiden

¹⁾ Die zweite Ablesung dieses Versuchs erfolgte erst nach fünf, statt nach drei Stunden.

Flüssigkeiten bis zu 50 % mit Ammonsulfat, so ergeben beide Reihen ganz gleich starke Flockenbildung bzw. Trübungen, d. h. also, daß in beiden gleich viel Globulin vorhanden ist, bei gleichem Antitoxingehalt, oder daß die einfache Verdünnung und die Adsorption durch Kohle bei Zugrundelegung des gleichen Antitoxingehaltes denselben Effekt haben. Die nach Abschluß der Globulinfällung gewonnenen klaren Flüssigkeiten von beiden Reihen wurden nun zur Feststellung ihres Albumingehaltes mit Ammonsulfat gesättigt. Bei einer bestimmten Flüssigkeitsmenge war die Trübung im Abgusse noch deutlich, in der Serumverdünnung nur mehr angedeutet, weil eben die Kohle weniger Albumin gebunden hatte, während durch die Verdünnung des Serums Globulin und Albumin in gleichem Maße verringert werden.

Wir wollen uns nunmehr der eingangs gestellten Frage, in welcher Weise das an Kohle gebundene Antitoxin bzw. Toxin mit seinem Partner reagiert, zuwenden. Um dies Verhalten des Antitoxins zu studieren, wurde je 0,1 g Kohle mit verschiedenen Mengen des Immunsersums versetzt und in der früher beschriebenen Weise behandelt. Die Kohlsedimente wurden dann mit abgemessenen Toxinmengen versetzt — das Volumen betrug immer 2 ccm —, die Proben $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur unter öfterem Schütteln stehen gelassen, hierauf scharf zentrifugiert, die Sedimente und überstehenden Flüssigkeiten in der üblichen Weise auf ihren Lysingehalt untersucht. Gleichzeitig wurden auch Kohlenproben mit entsprechenden Mengen von normalem Pferdeserum vorbehandelt und dann mit Toxin versetzt. Solche Parallelversuche waren notwendig, um zu sehen, in welcher Weise die Adsorptionskraft der Kohle für Toxin durch das Pferdeserum an sich beeinflußt wird. Der Kürze und Übersichtlichkeit wegen sind in der folgenden Tabelle IV einige derartige Versuche mit wechselnden Mengen von Toxin und Antitoxin zusammengestellt.

Das auffallendste Ergebnis dieser Versuche ist, daß das an Kohle adsorbierte Immuns Serum auch unter den günstigsten quantitativen Verhältnissen nicht imstande ist, Toxin zu neutralisieren, denn selbst bei Zusatz von 0,1 ccm Antitoxin, von dem etwa 100 entgiftende Dosen gebunden werden, und nur drei hämolytischen Dosen, ist sogar der vierte Teil der Sedimentaufschwemmung noch etwas giftig. Die überstehende Flüssigkeit enthält allerdings kein nachweisbares Toxin mehr. Werden größere Giftmengen (20 bis 30 lösende Dosen) der mit Antitoxin vorbehandelten Kohle hinzugefügt, so lassen sich auch noch in Bruchteilen der überstehenden Flüssigkeiten merkliche Quantitäten von Hämolysin nachweisen, während die nicht vorbehandelte Kohle von 50 Toxindosen so gut wie alles bindet, so daß selbst der ganze Abguß nur mehr ganz schwach löst. Auch die Sedimente der

mit Immunsorum präparierten Kohleaufschwemmungen sind für rote Blutkörperchen viel giftiger als die von reiner, wenn beiden gleich viel Hämotoxin zugesetzt wird. Besonders augenfällig wird die vollständige Unwirksamkeit des an Kohle gebundenen Antitoxins durch die Tatsache, daß kleine Mengen davon keinen Einfluß auf die Bindungskraft der Kohle für Toxin haben, mittlere und größere diese aber immer mehr herabsetzen, genau in gleichem Maße wie normales Pferdeserum. Diese Erscheinung ist so zu erklären, daß das Immunsorum bei gleichzeitigem Erlöschen jeder Antitoxinwirkung so wie Normalserum die Oberfläche der Kohle besetzt und dadurch zur Toxinadsorption ungeeignet macht. Dieser Effekt ist auf zweierlei Weise festzustellen. Erstens dadurch, daß die mit Serum vorbehandelte Kohle viel weniger Gift bindet als die gewöhnliche, zweitens aber dadurch, daß erstere, obwohl sie weniger Hämolyse an sich gerissen hat, trotzdem viel stärker Blut löst als letztere; aus dieser Beobachtung muß geschlossen werden, daß die Festigkeit der Bindung durch Besetzung der Oberfläche eine viel geringere ist. Die Größe der Bindung scheint auch unter solchen Bedingungen, wie speziell darauf gerichtete Versuche mit $\frac{1}{2}$ - und 5stündiger Bindungszeit gezeigt haben, etwas zuzunehmen, nicht aber deren Festigkeit.

Wir können uns nun der Untersuchung der zweiten Frage zuwenden, wie das an Kohle gebundene Toxin mit dem Antitoxin reagiert. Auf die Versuchsanordnung braucht nicht mehr näher eingegangen zu werden, da sie mit der früher beschriebenen vollkommen gleich ist. Bemerkt sei bloß, daß die toxinbeladene Kohle dann noch $\frac{1}{2}$ Stunde mit dem antitoxischen Serum in Berührung blieb. Ausgewertet wurde die lösende Kraft der Kohlsedimente und die hemmende der Abgüsse, um auf diese Weise die Menge und die Wirkung des gebundenen Antitoxins nachweisen zu können. Die näheren Daten sind ohne weiters aus der Tabelle V ersichtlich.

Aus diesen Versuchen geht sehr deutlich hervor, daß die mit Toxin vorbehandelte Kohle mehr Antitoxin bindet als die unvorbehandelte, selbst bei einem Serumüberschuß. Bei einem Verhältnis von Toxin zu Antitoxin wie $1:2\frac{1}{2}$ ist dieser Unterschied noch deutlich, bei einem Verhältnis von $1:6$ noch angedeutet. Diese Erscheinung ist um so bemerkenswerter, als man ja berücksichtigen muß, daß die Kohle durch vorherige Adsorption des Toxins einen Teil ihrer Bindungsfähigkeit eingebüßt hat, wie wir es bei der mit Immunsorum beladenen Kohle in den vorhergehenden Versuchen gesehen haben und wie auch der angeführte Versuch mit durch ungeimpfte Bouillon vorbehandelter Kohle zeigt, die nicht nur viel weniger Antitoxin bindet als die mit Gift besetzte, sondern auch viel weniger als reine. Man kann daher aus diesem Verhalten

Tabelle I.

Verhalten der mit Toxin beladenen Kohle zum Antitoxin.

Menge und Art des Zusatzes	Menge des zugesetzten Antitoxins ccm	Menge des Sediments ccm	Menge des Abgusses ccm	Resultat nach		Anmerkung
				1 h, 36° C	3 h, Zimmer- temperatur	
0.5 ccm Toxin	—	0.3 0.1	—	kompl. gel. f. kompl. gel.	kompl. gel. „	
0.5 ccm Toxin	0.035	1 0.3	— —	ungelöst „	ungelöst „	Von 50 Antitoxindosen sind 35 bis 4 gebunden.
—	0.035	—	0.1 0.05	„ part. gel.	Spur gel. kompl. gel.	
—	0.035	—	0.1 0.05	ungelöst Spur gel.	ungelöst part. gel.	Von 50 Antitoxindosen sind 3 gebunden.
0.5 ccm Bouillon	0.035	—	0.1 0.05 0.03	ungelöst „ Spur gel.	ungelöst ? stark gel.	Von 50 Antitoxindosen sind 4 gebunden.
0.5 ccm Toxin	0.15	—	0.01 0.015	ungelöst? ungelöst	Spur gel. ungelöst	
—	0.15	—	0.01 0.015	„ „	„ „	
0.8 ccm Toxin	0.1	—	0.015 0.02 0.025	part. gel. Spur gel. ungelöst	stark gel. part. gel. Spur gel.	
—	0.1	—	0.015 0.02 0.025	ungelöst? ungelöst „	Spur gel. ungelöst? ungelöst	

Tabelle VI.

Neutralisation des an Kohle gebundenen Toxins.

Menge des zu- gesetzten Toxins	Menge und Art des zugesetzten Serums	Menge des Sediments ccm	Menge des Abgusses ccm	Resultat nach		Anmerkung
				1 h, 36° C	3 h, Zimmer- temperatur	
0.5 ccm	0.06 ccm Imm.-Serum	1.7 — —	— 0.05 0.03	ungelöst „ part. gel.	ungelöst Spur gel. stark gel.	
0.5 ccm	0.04 ccm Imm.-Serum	1.7 — —	— 0.1 0.05	ungelöst „ part. gel.	ungelöst Spürh. gel. stark gel.	Von 60 Antitoxindosen sind 40 gebunden.
0.5 ccm	0.03 ccm Imm.-Serum	1.7 — —	— 0.1 0.05	ungelöst Spürh. gel. stark gel.	ungelöst? Spur gel. kompl. gel.	Von 42 Antitoxindosen sind 40 gebunden.
0.5 ccm	0.03 ccm Norm.-Ser.	0.3 0.1	— —	kompl. gel. f. kompl. gel.	„ „	

zweifellos annehmen, daß die Reaktionsfähigkeit des Toxins mit dem Antitoxin trotz seiner Bindung an Kohle vollkommen intakt ist, daß sich also das Gift gerade entgegengesetzt verhält wie das Serum.

Demgemäß gelingt es auch, das hämolytisch wirksame Toxin-Kohlensediment durch entsprechenden Antitoxinzusatz so zu beeinflussen, daß in dem angeführten Versuche die Hälfte einer derartigen Sedimentaufschwemmung unwirksam ist, während von derselben Toxin-Kohlensaufschwemmung ohne Immunserumzusatz noch ein Zwanzigstel das Blut vollständig löst.

Der folgende Versuch (Tabelle VI) soll zeigen, wieviel Antitoxin nötig ist, um das an Kohle gebundene Toxin zu neutralisieren, da in dem vorhergehenden Versuch nur die Hälfte der Kohlenaufschwemmung verwendet wurde.

Wenn also ungefähr 40 Antitoxindosen an die mit 50 Toxindosen beladene Kohle adsorbiert werden, wird diese vollständig entgiftet, aber selbst 30 Dosen genügen noch annähernd zu diesem Zwecke. Scheinbar sind also nicht einmal äquivalente Mengen Antitoxin zur Neutralisation des an Kohle fixierten Hämotoxins notwendig, wobei aber berücksichtigt werden muß, daß eben ein gewisser Teil des Toxins auch ohne Antitoxin von der Kohle festgehalten wird. Jedenfalls kann aber auch aus diesem Versuche angenommen werden, daß die Reaktionsfähigkeit zwischen Toxin und Antitoxin vollständig erhalten ist. Aus dem Versuche ist auch zu ersehen, wie eine entsprechende Normalserummengabe auf die Toxinkohle wirkt. Eine so behandelte Sedimentaufschwemmung löst selbst noch in der Menge von 0,1 ccm vollständig. Der durch die Serumeinwirkung bedingte längere Kontakt des Toxins mit der Kohle bewirkt nicht wie in reiner Kochsalzlösung eine Zunahme der Bindung, sondern ein solches Sediment verhält sich ebenso wie eines in Kochsalzlösung mit nur $\frac{1}{2}$ stündiger Bindungszeit, weil die Konkurrenz des Normalserums mit dem Toxin um die Kohlenoberfläche zur Geltung kommt.

Versuchsergebnisse.

0,1 g Kohle vermag in $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur annähernd 50 lösende Dosen zu binden und gibt ungefähr 6 Giftdosen an zugesetztes Blut wieder ab. Durch einfaches Waschen der beladenen Kohle ist kein Hämotoxin zu entfernen. Bis zu 10 Toxindosen fixiert die Kohle so fest, daß sie kaum etwas davon an Blut abgibt.

Auch Antitoxin wird von der gleichen Kohlenmenge adsorbiert; die Bindung nimmt mit steigender Serumkonzentration prozentuell ab.

Die Kohle gibt gebundenes Toxin beim Erhitzen auf 45 bis 60° C weder an Kochsalzlösung noch verdünntes normales Pferdeserum ab. Ebenso wenig wird adsorbiertes Antitoxin durch Digestion mit Kochsalzlösung bei dieser Temperatur abgegeben, an konzentriertes normales Pferdeserum höchstens in Spuren. Die Größe der Toxinbindung,

namentlich aber ihre Festigkeit nimmt sowohl mit der Zeit als auch der Temperatur zu; schon durch geringere Mengen von normalem Pferdeserum wird sie herabgesetzt.

Auch wenn das gesamte zugesetzte Toxin von der Kohle gebunden wird, verschwinden nur ungefähr 30 % des Stickstoffs aus der Bouillon.

Aus dem Vollserum wird von der Kohle viel mehr Antitoxin adsorbiert als Eiweiß. Verwendet man jedoch statt des Vollserums Globulinlösungen, so gehen Antitoxin- und Globulinverlust ungefähr parallel. Obige Differenz ist auf eine stärkere Bindung des Globulins gegenüber dem Albumin zurückzuführen.

Das an Kohle gebundene Antitoxin ist selbst in großem Überschuß nicht mehr imstande, Hämolysin zu neutralisieren. Der vollständige Verlust des Toxinbindungsvermögens, welchen das an die Kohle fixierte Immunserum erleidet, zeigt sich dadurch an, daß eine so vorbehandelte Kohle weniger Hämotoxin adsorbiert als reine, und daß das entsprechende Kohlensediment trotzdem stärker rote Blutkörperchen löst als letzteres.

Im Gegensatz zu dem Verhalten des Antitoxins, ist das spezifische Bindungsvermögen des Toxins auch nach seiner Bindung an Kohle vollständig erhalten und wird daher eine derartig präparierte Kohle durch entsprechende Antitoxinmengen entgiftet. In Übereinstimmung mit diesem Befunde wird die Adsorptionskraft der Kohle für Antitoxin durch Vorbehandlung mit Toxin nicht nur nicht herabgesetzt, sondern sogar erhöht.

2. Tetanustoxin und Antitoxin.

Dieselben Fragen, welche uns im vorhergehenden Abschnitt für das Vibrio-Hämotoxin und sein Immunserum beschäftigt haben, nämlich wie diese beiden Körper, wenn sie von Kohle gebunden sind, untereinander reagieren, bzw. wie sie die Adsorptionskraft der Kohle beeinflussen, sollen nun auch für das Tetanusgift und sein Gegen Gift beantwortet werden. Zu sämtlichen hierher gehörigen Versuchen wurde ein mit Ammonsulfat gefälltes und getrocknetes Gift von konstantem Werte verwendet, von dem zu jedem Versuche die entsprechende Lösung frisch bereitet wurde. Als Antitoxin diente ein Pferdeimmunserum, das pro Kubikzentimeter 2,5 Antitoxineinheiten enthält und ungefähr $1\frac{1}{2}$ Jahre alt war. Die Menge der Kohle betrug in allen diesen Versuchen wieder 0,1 g, das Flüssigkeitsvolumen 2 ccm, die Bindung erfolgte $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln. Als letale Dosis des Toxins wird diejenige Menge bezeichnet, welche eine Maus von 15 bis 20 g in etwa 48 Stunden tötet; sie beträgt 0,00002 g. Die zur Neutralisation der-

selben erforderliche Serumquantität, nämlich 0,000025 ccm ist als eine Antitoxindosis angeführt. Zum Verständnis der folgenden Tabelle sei noch bemerkt, daß in der Kolumne Abguß zweierlei Flüssigkeiten angeführt sind, nämlich die, welche nach dem Versetzen der Kohle mit Toxin durch Zentrifugieren gewonnen wurde und als solche zur Prüfung ihrer Giftigkeit Mäusen injiziert wurde, und dann auch die, welche nach dem Zusatz von Immuns serum zur Kohle gewonnen wurde. Ihr Antitoxingehalt wurde in der Weise bestimmt, daß abgemessene Mengen derselben mit je 0,00002 g = 1 letal. Dosis gemischt, $\frac{1}{2}$ Stunde stehen gelassen und dann Mäusen injiziert wurden.

Tabelle VII.

Verhalten der mit Immun- bzw. Normals erum beladenen Kohle zum Toxin.

Menge und Art des Serums	Menge des Toxins	Menge des Abgusses von		Menge des Sediments ccm	Resultat	Anmerkung
		Toxin ccm	Antitoxin ccm			
—	0,00004 g = 2 let. Dos.	1,8 —	—	— 2	gesund † 4 Tage	
—	0,0002 g = 10 let. Dos.	1,5 —	—	— 2	gesund † 2 Tage	Von 10 letalen Dosen alle geb.
0,00025 ccm I. = 10 A.-D.	dasselbe	1,5 —	—	— 2	gesund † 3 Tage	Von 10 Antitox.-Dosen alle geb.
			1,5	—	† 3 Tage	Von 10 letalen Dosen alle geb.
0,00025 ccm N.-S.	dasselbe	1,5 —	0,4	— 2	† 2 Tage gesund † 3 Tage	
1 ccm N.-S.	dasselbe	1,5 0,4	—	— 2	† 30 Stund. † 2 Tage † 5 Tage	Von 10 letalen Dosen höchstens 5 gebunden.
15 ccm I.-S.	dasselbe	—	—	2	† 4 Tage	
15 ccm N.-S.	dasselbe	—	—	2	† 3 Tage	
0,2 ccm I.-S.	dasselbe	1,5 0,4 —	—	— — —	gesund " "	Von 800 Antitoxin-Dosen 600 gebunden.
			0,01 0,02	— — 2	† 4 Tage	
0,01 ccm I.-S.	0,002 g = 100 let. Dos.	0,015 0,02 0,1	— — —	— — —	gesund † 8 Tage † 3 Tage	Von 100 letalen Dosen ungefähr 80 gebunden.
			0,02 0,05	— —	Tetan. überl. gesund	Von 400 Antitox.-Dosen 350 geb.
—	dasselbe	0,02 0,1 0,3	— — —	— — —	gesund Tetan. überl. † 3 Tage	Von 100 letalen Dosen ungefähr 93 gebunden.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß von 0,1 g Kohle beträchtliche Mengen von Tetanusantitoxin adsorbiert werden. 10 Antitoxindosen verschwinden vollständig, von 400 werden fast 90 %, von

800 Antitoxindosen 75 % gebunden. Die stärkere Bindung dieses Antikörpers gegenüber dem Antihämotoxin, von dem bei Zusatz von 50 Antitoxindosen nur 60 bis 80 % an die Kohle fixiert wurden, erklärt sich aus der stärkeren Wirksamkeit des Tetanusimmunserums und dem dadurch bedingten geringeren Eiweißgehalt der Adsorptionsflüssigkeit. Sind doch in 0,02 ccm Tetanusserum 800 Antitoxindosen enthalten, in 0,025 ccm des Vibrionuserums höchstens 50 Antitoxindosen. Unter Berücksichtigung des Eiweißgehalts dürfte also die Größe der Bindung für beide Antitoxine gleich sein.

Das an Kohle gebundene Tetanusantitoxin ist für das Toxin vollkommen wirkungslos, nicht nur wenn das Verhältnis beider wie 1:1 ist, sondern auch dann, wenn die Kohle mehrere hundert Male mehr vom ersteren enthält. Diese Unwirksamkeit des Antitoxins zeigt sich auch daran, daß mit Tetanusserum beladene Kohle ebenso wie die, welche normales Pferdeserum fixiert hat, weniger Gift bindet als reine. Nur ganz geringe Mengen von Serum lassen die Bindungskraft der Kohle unbeeinflusst.

Die in der nächsten Tabelle VIII zusammengestellten Versuche geben Aufschluß, wie das an Kohle gebundene Tetanustoxin mit seinem Antitoxin reagiert. Nach dem ersten Teile des Versuchs der Toxinadsorption wurde die überstehende Flüssigkeit auf ihre Giftigkeit geprüft und nach erfolgter Bindung des Serums der resultierende Abguß durch Versetzen abgemessener Mengen desselben mit je einer letalen Dosis auf noch vorhandenes Antitoxin untersucht.

Tabelle VIII.

Verhalten des an Kohle gebundenen Toxins zum Antitoxin.

Menge des zugeetzten Toxins	Menge des zugeetzten Antitoxins	Menge des Abgusses von		Menge des Sediments ccm	Resultat	Anmerkung
		Toxin ccm	Antitoxin ccm			
0,016 g = 800 let. Dos.	0,02 ccm = 800 A.-D.		0,02 0,04	— — 2	gesund — † 3 ½ Tage	
0,002 g = 100 let. Dos.	0,01 ccm = 400 A.-D.	0,02 0,1	— — 0,01 0,02 0,05	— — — — 2	gesund Tetan. überlebt " gesund † 30 Stunden	Von 400 A.-D. 300 gebunden.
—	0,01 ccm = 400 A.-D.		0,02 0,04	— —	Tetan. überlebt gesund	Von 700 A.-D. 350 gebunden.
0,0002 g = 10 let. Dos. dasselbe dasselbe	— 100 A.-D. 1000 A.-D. 10000 A.-D.			2 2 2 2	† 2 Tage † 3 Tage † 3 ½ Tage gesund	

Um Wiederholungen zu vermeiden, sei auf die in der früheren Tabelle angeführten Versuche hingewiesen, aus denen hervorgeht, daß zwar 10 letale Dosen noch vollständig von 0,1 g Kohle gebunden werden, diese Kohlenmenge aber nicht einmal zwei tödliche Giftdosen so fest zu fixieren vermag, daß bei Einbringung einer solchen Kohlenaufschwemmung unter die Rückenhaut der Maus, ihr Tod an Tetanus verhindert wird. Trotz dieser geringen Beständigkeit der Kohlentoxinverbindung im Tierkörper war es nicht möglich, diese Verbindung durch Erhitzen in Kochsalzlösung auf 50° C zu spalten. Wenn 0,1 g Kohle selbst mit 100 letalen Dosen versetzt worden war, von denen nach den früher erwähnten Versuchen mindestens 90 Dosen gebunden werden, ließ sich in der Digestionsflüssigkeit keine toxische Wirkung nachweisen.

Um zu entscheiden, ob eine Neutralisation des an die Kohle gebundenen Toxins durch Immuneserum möglich ist, wurde die mit Tetanustoxin präparierte, dann mit Antitoxin versetzte und hierauf zentrifugierte, eventuell noch gewaschene Kohle in 2 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt und Mäusen injiziert. Es hat sich nun gezeigt, daß das an Kohle adsorbierte Gift, im Gegensatze zum Vibriotoxin, nicht nur durch äquivalente, sondern auch durch beträchtlich größere Antitoxinmengen nicht neutralisierbar ist. Erst ein ungefähr 400 facher Überschuß ist imstande, die Entgiftung herbeizuführen. Im Zusammenhang mit dieser Erscheinung steht auch der Befund, daß die mit Tetanustoxin präparierte Kohle weniger Antitoxin bindet als unvorbehandelte, während wir gesehen haben, daß das Vibrio-Hämotoxin die Adsorptionskraft der Kohle für Antitoxin nicht nur nicht herabsetzt, sondern sogar steigert. Zu bemerken wäre noch, daß der Tod der mit Kohlenaufschwemmungen injizierten Mäuse zuweilen zeitliche Unregelmäßigkeiten aufwies, insofern die Lebensdauer nicht immer genau mit der berechneten Toxinmenge übereinstimmte. Solche Schwankungen dürften in den wechselnden Resorptionsverhältnissen begründet sein. Bei den eingegangenen Mäusen fand sich unter der Rückenhaut eine ziemlich fest haftende Kohlenschicht, in deren Umgebung das Gewebe etwas hyperämisch war.

Versuchsergebnisse.

Von 0,1 g Kohle werden infolge der hohen Wirksamkeit des Tetanusserums beträchtliche Antitoxinmengen gebunden. Dieses Antitoxin übt selbst in großem Überschuß keine Wirkung mehr auf das Toxin aus und setzt ebenso wie normales Pferdeserum die Bindungskraft der Kohle für das Gift herab.

Auch das Toxin wird in hohem Maße gebunden, so daß von 100 letalen Dosen der größte Teil aus der Flüssigkeit verschwindet,

aber selbst mit nur zwei letalen Dosen beladene Kohle verursacht noch den Tod der injizierten Maus. Dagegen findet in vitro durch Digestion mit Kochsalzlösung bei 50° C keine Toxinabspaltung statt, auch wenn der Kohle 100 letale Dosen zugesetzt worden waren.

Das an Kohle adsorbierte Gift wird erst durch einen kolossalen Antitoxinüberschuß neutralisiert.

Eine mit Toxin vorbehandelte Kohle bindet weniger Antitoxin als unvorbehandelte.

8. Diphtherietoxin und Antitoxin.

Das Diphtheriegift ist in vielen Beziehungen verschieden vom Tetanusgift, vor allem zeichnet es sich durch eine viel größere Avidität zu seinem Antitoxin aus. Schon aus diesem Grunde glaubte ich, dieselben Untersuchungen, über die in den beiden vorhergehenden Abschnitten mit dem Vibriohämotoxin und dem Tetanustoxin berichtet wurde, auch für das Diphtheriegift und sein Antitoxin anstellen zu sollen. Zu allen Versuchen wurde dasselbe Antitoxin benutzt, ein nahezu 1 Jahr altes, nicht carbolisiertes Pferdeserum, das 200 I.-E. pro Kubikcentimeter enthielt, und zwei verschiedene Bouillongifte. Eines war mit dem Stamme „Amerika“ hergestellt, schon mehrere Jahre alt und hatte von seinem ursprünglichen Wert bereits erheblich verloren. Zur Zeit der Versuche betrug die L + 0,43 ccm, die Dos. letal. simplex, schon vor einiger Zeit bestimmt¹⁾, 0,01 ccm, so daß in 1 L + ungefähr 40 letale Dosen enthalten waren. Das andere Gift war mit dem Stamme „Kling“ hergestellt und erst einige Monate alt. Seine L + war 0,40 ccm, die einfache letale Dosis 0,005 ccm, so daß in einer L + 80 letale Dosen vorhanden waren. Da in manchen dieser Versuche größere Serummengen zur Anwendung kommen, habe ich teilweise 0,2 g statt 0,1 g Kohle genommen.

Durch die in den beiden folgenden Tabellen zusammengestellten Versuchsbeispiele soll dargetan werden, wie unvorbehandelte Kohle Antitoxin und Toxin bindet, bzw. letzteres fixiert, was durch Injektion der Kohlenaufschwemmung bei Meerschweinchen geprüft wurde. Weiter soll gezeigt werden, in welcher Weise Antigen und Antikörper, wenn einer von ihnen an Kohle gebunden ist, miteinander reagieren. Zur Bindung wurde der betreffende Körper mit der Kohle in 2 ccm Kochsalzlösung zusammengebracht und unter öfterem Schütteln $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde zentrifugiert, das Sediment gewaschen, die

¹⁾ Wegen Tiermangel mußten diese Versuche nach Möglichkeit beschränkt werden.

überstehenden Flüssigkeiten entweder auf ihren Antitoxingehalt durch Mischung abgemessener Mengen von ihnen mit je einer L + ausgewertet, oder zur Bestimmung ihrer Toxizität in abgestuften Dosen injiziert. Ob das an die Kohle gleichzeitig gebundene Toxin und Antitoxin aufeinander im Sinne der Neutralisation des ersteren eingewirkt hatten, wurde durch Injektion der Kohlenaufschwemmung an Meerschweinchen festgestellt. Durch Injektion von gleichen Mengen reiner Kohle konnte ich mich überzeugen, daß diese als harte Einlagerung, häufig in Form von Knötchen zu fühlen ist und höchstens ganz geringe Schwellung der nächsten Umgebung bewirkt, so daß auch bei den Tieren, welche nicht den typischen, durch Sektion festgestellten Diphtherietod starben, sondern nur Infiltrate bekamen, eine Verwechslung mit den durch die Kohle an sich bewirkten Erscheinungen nicht zu befürchten war.

Die Tabelle IX enthält Versuche mit Diphtherieserum und sein Verhalten zum Toxin.

Tabelle IX.

Verhalten des Antitoxins bei der Bindung durch Kohle.

Menge der Kohle g	Menge des Serums	Menge des Toxins	Menge des Abgusses von		Menge des Sedi- ments	Resultat	Anmerkung
			Toxin ccm	Antitoxin ccm			
0,2	0,4 ccm = 80 I.-E.	—	—	0,03		Strang glatt	Von 80 L.E. 40 geb.
			—	0,05			
			—	0,07			
0,2	0,4 ccm = 80 I.-E.	0,43 ccm Amerika	0,03	—	2 ccm	? Strang hartes Inf. † 4 Tage	
			0,05	—			
			0,1	—			
0,1	0,04 ccm = 8 I.-E.		—	0,6		glatt	Von 8 L.E. höchstens 4 bis 5 geb.
			—	1,0			

Von 0,2 g Kohle werden bei Zusatz von 80 I.-E. ungefähr 40 gebunden; diese große Antitoxinmenge vermag aber nicht einmal eine L + zu entgiften, was beweist, daß auch das Diphtheriantitoxin trotz seiner beträchtlichen Avidität zum Toxin durch die Kohle seiner Bindungskraft vollständig beraubt wird.

Die in der folgenden Tabelle X zusammengestellten Versuche beschäftigen sich mit der Adsorption der beiden Diphtheriegifte und dem Verhalten der mit Toxin präparierten Kohle zum Antitoxin.

Wir sehen aus diesen Versuchen, daß die Kohle beide Toxine zu binden, aber nur ungefähr zwei letale Dosen so weit festzuhalten vermag, daß nicht mehr der Tod des Tieres eintritt.

Tabelle X.
Verhalten der mit Toxin beladenen Kohle zum Antitoxin.

Menge der Kohle g	Menge des Toxins ccm	Menge des Serums	Menge d. Abgusses v.		Menge d. Sedi- ments ccm	Resultat	Anmerkung
			Toxin ccm	Antitoxin ccm			
0,2	0,43 Amer.	—	0,03 0,05 0,1	— — —	— — —	glatt hart. Inf. Inf. † 6 Tage	
0,2	0,43 Amer.	0,4 ccm = 80 I.-E.	—	0,03 0,05 0,07	0,5 — —	gr. Inf. überl. glatt † 4 Tage	
0,1	0,43 Amer.	0,04 ccm = 8 I.-E.	—	1,0 0,6 1,0 0,6	— — — —	glatt " " "	Von 8 I.-E. höchstens 4 gebunden.
0,1	0,024 Amer.	—	—	—	—	hart. Inf. † 6 Tage	
	0,05 "	—	—	—	—	† 4 Tage	
	0,43 "	—	—	—	2	kl. Inf. überl.	
	0,15 "	0,4 ccm = 80 I.-E.	—	—	2		
0,1	0,012 Kling.	—	—	—	2	glatt?	
	0,05 "	—	—	—	2	† 4 Tage	
	0,06 "	—	—	—	2	† 3 Tage	
	0,05 "	0,4 ccm = 80 I.-E.	—	—	2	glatt	
0,1	0,8 "	0,02 ccm = 4 I.-E.	1,2 0,7 1,2 0,7	— — — —	— — — —	" " Strang † 2 Tage	Von 4 I.-E. höchstens 1 gebunden. Von 4 I.-E. etwa 3 ge- bunden.

Trotz dieser beträchtlichen Abgabe des gebundenen Toxins im Tierkörper gelang es nicht, durch Digestion von 1 g mit 0,2 ccm Kling beladener Kohle bei 50°C in Kochsalzlösung, mit dieser irgend eine Giftwirkung zu erzielen. Das an Kohle gebundene Toxin braucht zur Entgiftung einen kolossalen Antitoxinüberschuß, deshalb ist nur die Neutralisation einer kleinen Toxinmenge durchführbar, da sonst nicht genug Serum von der Kohle gebunden werden kann. Die beiden verwendeten Toxine verhielten sich ziemlich gleich; von beiden ließen sich noch ungefähr 10 letale Dosen entgiften. Entsprechend der schweren Neutralisierbarkeit des an Kohle gebundenen Toxins bindet eine mit Gift vorbehandelte Kohle weniger Antitoxin als reine. Dieser Unterschied ist jedoch nur bei einem großen Toxinüberschuß und 0,1 g Kohle deutlich zu erkennen. Bei Verwendung von 0,2 g Kohle oder auch von 0,1 g und weniger großen Toxinmengen ist dieser Unterschied nur angedeutet, wenn wir die Bindungsergebnisse mit Diphtherieserum in der Tabelle IX vergleichen.

Versuchsergebnisse.

Diphtherietoxin und Antitoxin werden von Kohle unter geeigneten Bedingungen gebunden. Von dem adsorbierten Toxin wird ein großer Teil im Meerschweinchen wieder abgespalten und nur ungefähr zwei letale Dosen festgehalten. Durch Digestion toxinbeladener Kohle in Kochsalzlösung bei 50° C wird kein Gift abgespalten.

Das an Kohle gebundene Antitoxin vermag auch in großem Überschuß nicht mehr Toxin zu neutralisieren. An Kohle gebundenes Diphtheriegift wird zwar nicht von äquivalenten, wohl aber noch von sehr großen Serummengen neutralisiert; es setzt die Bindungskraft der Kohle für Antitoxin herab.

4. Präcipitin- und Komplementbindung durch an Kohle adsorbiertes Pferdeserum.

Wie ich in der Einleitung zu dieser Mitteilung erwähnt habe, konnte ich in früheren Versuchen nachweisen, daß das Antitoxin, auch wenn es Toxin neutralisiert hat, noch immer mit Präcipitin reagiert. Andererseits haben die vorliegenden Untersuchungen gezeigt, daß alle drei geprüften Antitoxine durch Adsorption an Kohle vollkommen unwirksam werden. Aus Rücksicht auf diese Befunde war es notwendig, noch zu untersuchen, ob das von Kohle adsorbierte Antitoxin bzw. Pferdeserum Präcipitin zu binden vermag und, wenn ja, ob diese Verbindung auch zur spezifischen Komplementbindung geeignet ist.

Die diesbezüglichen Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß verschiedene Kohlenmengen mit wechselnden von antitoxischem Pferdeserum in der üblichen Weise vorbehandelt, die Kohle gewaschen und hierauf mit Präcipitin versetzt wurde. Nach halbstündiger Bindungszeit wurde die Kohle wieder abzentrifugiert und die Abgüsse durch Zusatz entsprechender Mengen von Pferdeserum auf ihren Präcipitingehalt geprüft. Gleichzeitig wurde derselbe Versuch mit unvorbehandelter Kohle angesetzt, um die Bindung des Präcipitins durch die Kohle an sich feststellen zu können. Bei allen Bindungen betrug das Flüssigkeitsvolumen 2 ccm.

Nur in dem ersten der angeführten Versuche war keine Differenz in der Präcipitinbindung zwischen reiner und mit Pferdeserum vorbehandelter Kohle, erstens weil die benutzte Pferdeserummenge für 0,1 g verhältnismäßig gering war und zweitens besonders deshalb, weil dann von der in 2 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmten Kohle nur 0,2 ccm, also der zehnte Teil, zum Präcipitin zugesetzt wurden. In den drei anderen Versuchen hat die mit Pferdeserum beladene Kohle alles Präcipitin oder wenigstens bedeutend mehr als die reine gebunden. Die Bindung durch letztere war relativ schwach, im

Tabelle XI.

Bindung von Präcipitin durch an Kohle adsorbiertes Pferdeserum.

Menge der Kohle g	Menge des Pferdeserums ccm	Menge des Kohlen-sediments ccm	Menge des Präcipitins ccm	Resultat	Anmerkung
0,1	0,035	0,2	0,1	starke Präcipit.	Kein Unterschied
0,1	—	0,2	0,1	"	
0,1	0,1	2	0,05	negativ	Dieselbe Menge von Präcipitin und Pferdeserum ohne Kohle deutl. positiv
0,1	—	2	0,05	schwach positive Reaktion	
0,1	0,1	2	0,1	negativ	Nach läng. Zeit Spur trüb.
0,1	—	2	0,1	positiv	Reakt. etwas schwächer als mit gleicher Menge von Präcipitin u. Pferdeserum ohne Kohle.
0,02	0,001	2	0,05	schwach positiv	Zunächst negativ, erst nach 3 h etwas trüb.
0,02	—	2	0,05	stark positiv	Kau. schwächere Fällung als mit denselben Mengen von Pferdeserum u. Präcipitin ohne Kohle.

letzten Versuch kaum angedeutet, wenn zum Vergleich dieselben Mengen von Pferdeserum und Präcipitin ohne Kohle gemischt wurden.

Die nächsten Versuche sollen zeigen, ob solche an der Kohlenoberfläche vor sich gehende Präcipitationen imstande sind, in spezifischer Weise Komplement zu binden. Wechselnde Mengen einer mit Pferdeserum präparierten Kohlensedimentaufschwemmung wurden mit abgemessenen Mengen von Präcipitin und in allen Versuchen mit 0,025 ccm Meerschweinchen-Komplement versetzt und unter nochmaligem Umschütteln $\frac{1}{2}$ Stunde bei 36°C digeriert. Der Zusatz des Präcipitins und Komplements zur präparierten Kohle erfolgte entweder gleichzeitig, oder der des Komplements erst $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem des Präcipitins. Nach erfolgter Digestion des Komplements mit der Kohlenaufschwemmung wurde allen Röhrchen je 1 ccm sensibilisierter Hammelblutaufschwemmung zugesetzt und nach verschiedenen Zeiten der Grad der Hämolyse notiert. Zur Kontrolle wurden gleiche Versuche mit nicht vorbehandelter Kohle und Präcipitin, und auch solche mit Pferdeserum und Präcipitin ohne Kohle, schließlich das hämolytische System ohne irgendwelchen Zusatz aufgestellt. In dieser Tabelle Nr. XII ist auch ein Versuch angeführt über die Komplementbildung durch Kohle, welche früher größere Mengen von Pferdeserum adsorbiert hat.

Zunächst zeigt sich, wie ja zu erwarten war, daß die Adsorptionskraft der Kohle für Komplement durch vorherige Behandlung mit Pferdeserum infolge Besetzung der Oberfläche herabgesetzt wird. Diese Erscheinung ist natürlich nur dann zu beobachten, wenn

Tabelle XII.

Komplementbindung durch reine unvorbehandelte Kohle.

	Menge des Pferde- serums ccm	Präcipitin ccm	Menge des Kohlen- sediments ccm	Komple- ment ccm	Resultat			Anmerkung
					15'	20'	30'	
5 5 5	0,1			0,025	Spur gel.		kompl. gel.	Auch nach mehreren Stunden ungelöst.
	0,05			0,025	?		"	
	—			0,025	ungelöst		ungelöst	
	0,1			0,025	stark gel.		kompl. gel.	
	0,05			0,025	part. gel.		f. kompl. gel.	
1	—			0,025	ungelöst		part. gel.	Der Komplementzu- satz erfolgt erst $\frac{1}{2}$ h nach d. d. Präcipitins. Das hämolyt. System aller ist innerhalb 20' komplett gelöst.
	0,035	0,1	0,02	0,025		kompl. gel.		
			0,05	0,025		"		
			0,1	0,025		f. kompl. gel.		
			0,2	0,025		stark gel.		
			0,4	0,025		part. gel.		
			0,02	0,025		kompl. gel.		
			0,05	0,025		"		
			0,1	0,025		f. kompl. gel.		
			0,2	0,025		stark gel.		
02 02 — .02 .02	0,001	0,05		0,025		ungelöst		Auch nach 10 h ungel. Auch nach 10 h ungel. Nach 1 h part. gelöst. Nach 1 h ungelöst.
	—	0,05		0,025		kompl. gel.		
	0,001	0,05		0,025		ungelöst		
	0,0001	0,05		0,025		"		
	—	0,05		0,025		kompl. gel.		
—	0,0001	0,05		0,025		ungelöst		

relativ große Mengen von Pferdeserum zur Vorbehandlung verwendet werden, nicht aber bei kleineren Mengen, wie solche bei den spezifischen Komplementbindungsversuchen benutzt wurden. Ein positives Resultat war bei diesen dann zu erzielen, wenn Präcipitin und Komplement gleichzeitig zur präparierten Kohle zugesetzt wurden, nicht aber, wenn der Komplementzusatz erst nach stattgefundener Präcipitinbindung an die Kohle erfolgte. Bei einer derartigen Versuchsanordnung unterscheidet sich, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, die Bindungskraft der vorbehandelten Kohle trotz Präcipitinzusatz nicht von der reinen. Im anderen Falle genügen jedoch schon kleine Mengen von Pferdeserum und Präcipitin, um deutliche Komplementbindung zu bewirken, Mengen, welche an sich an Kohle gebunden die Hämolyse nicht hemmen. Immerhin üben die entsprechenden Mengen von freiem Pferdeserum und Präcipitin eine stärkere Wirkung aus als bei der Bindung an Kohle, wie bei Verwendung von nur 0,0001 ccm Pferdeserum zu merken ist. Große Bedeutung kommt dem Schütteln während der Digestion des Komplements zu, wodurch die rasche Sedimentierung der Kohlenteilchen

verhindert und eine viel innigere Berührung zwischen ihnen und dem Meerschweinchenserum stattfindet. Wird das Schütteln unterlassen, so sind alle Proben, die sonst deutliche Hemmung der Lyse aufweisen, schon innerhalb der ersten $\frac{1}{2}$ Stunde komplett gelöst.

Versuchsergebnisse.

Unter Einhaltung geeigneter Versuchsbedingungen vermag das an Kohle adsorbierte Pferdeserum Präcipitin zu binden. Ersteres setzt in größeren Mengen die Bindungskraft reiner Kohle für Meerschweinchenkomplement herab. Werden entsprechende Mengen von Präcipitin und Komplement zu der mit Pferdeserum präparierten Kohlaufschwemmung zugesetzt, so erfolgt spezifische Komplementbindung. Diese bleibt aber aus, wenn der Komplementzusatz erst $\frac{1}{2}$ Stunde nach dem des Präcipitins stattfindet, oder wenn die Proben während der Digestion des Komplements nicht geschüttelt werden.

5. Schlußfolgerungen.

Bei der Besprechung der vorliegenden Versuchsergebnisse soll von theoretischen Erörterungen über das Wesen der Adsorption abgesehen werden, um so mehr, als, wie bereits erwähnt wurde, über den Adsorptionsprozeß und alle die zahlreichen Faktoren, welche seinen Ausfall beeinflussen können, derzeit noch nicht so weit Klarheit herrscht, daß sich aus solchen Erörterungen für die uns beschäftigenden Phänomene ein wesentlicher praktischer Nutzen erwarten ließe ¹⁾.

Überblicken wir die erhaltenen experimentellen Befunde, so ist vor allem die Tatsache hervorzuheben, daß alle drei untersuchten Antitoxine — das Antihämotoxin gegen Vibriolysin, das Tetanus- und Diphtherieantitoxin — durch die Adsorption an Kohle das Bindungsvermögen für ihr spezifisches Toxin vollständig verlieren. Selbst wenn die Kohle ein Vielfaches der zur Neutralisation der entsprechenden Giftdosis erforderlichen Antitoxinmenge an sich gerissen hat, findet keine Entgiftung statt. Zwei weitere Erscheinungen lassen die Unwirksamkeit des an Kohle adsorbierten Antitoxins erkennen. Erstens bindet die mit Antitoxin beladene Kohle weniger Toxin als reine, zweitens ist diese Kohle trotz ihres geringeren Toxin gehaltes giftiger als die, welche nur Toxin allein, wenn auch im stärkeren Maße gebunden hat. Beide Erscheinungen lassen sich ohne weiteres verstehen, wenn wir berücksichtigen, daß die Oberfläche der Kohle durch das unwirksam gewordene Antitoxin besetzt ist, so daß

¹⁾ Daher glaube ich auch, von einer Anführung der diesbezüglichen Literatur absehen zu können.

sie nunmehr an Adsorptionskraft verloren hat und die noch stattfindende Bindung viel lockerer ist.

Das Unwirksamwerden des Antitoxins durch die Bindung an Kohle erinnert an das durch Präcipitinzusatz bewirkte gleiche Phänomen. Wenn auch beide Prozesse wesentlich verschieden sind, so kommt ihnen doch ein gemeinsames Merkmal zu, nämlich die Bildung von größeren, das Antitoxin einschließenden Komplexen, wodurch, abgesehen von allen anderen Folgen, dessen Dispersität und weiter dessen Oberflächenwirkung herabgesetzt wird.

Hervorgehoben ist, daß das an Kohle gebundene Pferdeimmuneserum trotz Verlustes seiner Antitoxinwirkung imstande ist, spezifisches Präcipitin zu binden, und daß diese Kombination auch zur Komplementbindung fähig ist. Nun wird ja die Präcipitinreaktion durch das Pferdeserumeiweiß als solches, unabhängig von seiner Antikörperfunktion, hervorgerufen, da sie ja auch dem normalen Pferdeserum zukommt. Diese sozusagen allgemeinere, dem Eiweißmolekül infolge seiner chemischen Konstitution innewohnende Eigenschaft wird durch die Kohle nicht alteriert, wohl aber die spezielle, viel feiner abgestimmte Anti-Körperfunktion, die das Eiweißmolekül infolge der Immunisierung erwirbt. Es wäre hier auf den von *mir* (5) erhobenen Befund hinzuweisen, daß das Antitoxin auch nach der Bindung des Toxins noch präcipitierbar ist, und auf die Beobachtung von *Doerr* und *Moldovan* (11), daß das im Präcipitat enthaltene Immuneserum zwar seinen Eiweißcharakter und damit seine anaphylaktogene Fähigkeit bewahrt, dagegen seine Antikörperfunktion (Präcipitin und anaphylaktischer Antikörper) verliert. Auch dieser Befund zeigt also, daß die Antikörperfunktion verloren geht, bevor es noch zu einer tiefer greifenden Veränderung des Eiweißmoleküls kommt.

Auch andere Beobachtungen lassen auf äußerst feine Veränderungen im Serum infolge des Immunisierungsprozesses schließen. Z. B. wurde bereits erwähnt, daß *ich* gemeinsam mit *Tsuru* (3) feststellen konnte, daß aus zwei ziemlich gleich hochwertigen Pferdeimmunesera durch Kohle Antilysin unter denselben Versuchsbedingungen in ungleichem Maße adsorbiert wurde. Ferner gibt *Zunz* (6) an, daß Tierkohle aus konzentriertem Pferdeserum zwar Tetanusantitoxin, nicht aber Diphtherieantitoxin bindet, sondern letzteres nur dann, wenn es nach der Methode von *Frouin*, d. i. durch Entfernung eines großen Teiles des Serumeiweißes hergestellt ist, wodurch eine Erleichterung der Adsorption bewirkt wird. Eine in letzter Zeit erschienene Arbeit von *Bleyer* (12) enthält die Angabe, daß Agglutinine gleicher Spezifität, aber verschiedenen Seris entstammend, inkongruente Adsorptionsbilder lieferten, wie auch schon früher von *mir* und *Tsuru* (3) gefunden wurde. Da im Blutserum ein sehr kom-

pliziertes Medium vorliegt, so können für den Ausfall der Adsorption verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Ist ja schon das Eiweiß, welches uns in erster Linie interessiert, nicht einheitlich, und wir haben gesehen, daß die Bindung des Eiweißes aus verdünntem Pferdeserum hinter der des Antitoxins zurückbleibt und nur dann, wenn reine Globulinlösungen verwendet werden, parallel mit dieser letzteren geht. Demgegenüber fand *Bleyer* (12), daß Tierkohle Eiweiß und Agglutinin aus Serum in gleichem Maße adsorbiert; er hat aber mit Ziegenserum gearbeitet, in dem nach *E. Pick* die Antikörper anderen Eiweißfraktionen angehören als im Pferdeserum.

Während sich also die untersuchten Antitoxine bezüglich ihrer Reaktionsfähigkeit mit ihren Toxinen nach der Bindung an Kohle einheitlich verhalten haben, ließen sich für die geprüften Toxine in dieser Beziehung wesentliche Unterschiede feststellen. Das *Vibriohämotoxin* erleidet durch die Adsorption an Kohle überhaupt keine Veränderung, weil es von äquivalenten Antitoxinmengen neutralisiert wird und die Bindungskraft der Kohle für Antitoxin, trotzdem deren Oberfläche bis zu einem gewissen Grade bereits besetzt ist, erhöht. Ganz anders verhält sich das Diphtherie- und Tetanusgift. Die mit einem dieser beiden Toxine beladene Kohle bindet nicht nur nicht mehr, sondern sogar weniger Antitoxin als reine. Dementsprechend brauchen die beiden Gifte auch einen großen Antitoxinüberschuß zu ihrer Neutralisation. Diese Differenzen im Verhalten der Toxine dürften wohl auf ihre verschiedene chemische Beschaffenheit zurückzuführen sein. Vielleicht darf man annehmen, daß, da die hochmolekularen Antitoxine des Pferdeserums, welche den Globulinen angehören, durch die Adsorption an Kohle ihrer Bindungskraft für Toxin vollständig beraubt werden, das unbeeinflussbare Hämotoxin weniger komplex gebaut ist als das Diphtherie- und Tetanusgift.

Trotz der durch Kohle bewirkten Beeinträchtigung der Antitoxinbindung für die beiden letzteren Gifte ist ihre zellschädigende Funktion nicht alteriert. Die angeführten Versuche lassen vermuten, daß sie viel weniger fest an der Kohle haften als das Hämotoxin. Denn während von letzterem mindestens zehn lösende Dosen von 0,1 g Kohle fixiert werden, vermag die gleiche Kohlenmenge nur ungefähr zwei letale Dosen von Diphtherietoxin so weit festzuhalten, daß das damit injizierte Tier gesund bleibt, vom Tetanusgift kann aber nicht einmal diese Menge unschädlich gemacht werden. Für das Hämotoxin liegen nun allerdings insofern andere Verhältnisse vor, als die toxinbeladene Kohle in vitro mit den giftempfindlichen roten Blutkörperchen zusammengebracht wird, dagegen wurden sowohl Diphtherie- wie Tetanuskohle in den Tierkörper einverleibt. Immerhin wird man annehmen können, daß die verschiedene Haft-

festigkeit in der differenten Natur der betreffenden Gifte begründet ist, zumal, da ja mehrfache Beobachtungen dafür sprechen, daß das Tetanustoxin zwar sehr leicht von vielen Substanzen gebunden, aber auch ebenso leicht wieder abgegeben wird. Ist ja auch die Tetanustoxin-Antitoxinverbindung im Anfange sehr locker. An Kochsalzlösung wurde allerdings in den angestellten Versuchen durch Erwärmen kein Tetanusgift von der beladenen Kohle abgegeben.

Für das Verhalten des gebundenen Toxins zu seinem Antitoxin muß aber auch die Art des betreffenden Sorbens berücksichtigt werden. Obige für die Kohle gemachten Beobachtungen und Erörterungen gelten nicht mehr, wenn das Vibriotoxin an rote Blutkörperchen gebunden ist. Ein solches Toxin vermag, wie ich in Bestätigung der Versuche von *Kraus* und *Amiradzibi* (13) neuerdings feststellen konnte, kein Antitoxin zu binden¹⁾. Deshalb können aus dem Verhalten der an Kohle adsorbierten Toxine zum Antitoxin nur mit einer gewissen Reserve Schlüsse auf das Verhalten der an tierische Zellen gebundenen Gifte bezüglich ihrer Neutralisierbarkeit gezogen werden. Jedenfalls aber scheinen die Chancen in letzterem Falle viel ungünstiger zu sein wie bei Verwendung von Kohle, die an und für sich Antitoxin an sich reißt, was die tierischen Zellen nicht tun. Um so begreiflicher ist es nach den vorliegenden Untersuchungen, daß die ausgebrochene Erkrankung an Tetanus oder Diphtherie so schwer und nur durch exzessive Heilserumdosen zu beeinflussen ist, eine Tatsache, die durch zahlreiche Beobachtungen, sowohl im Tierexperiment als auch am Menschen festgestellt ist.

Literatur.

1) *Dehne* und *Hamburger*, Wien. klin. Wochenschr. 1904. — 2) *Kraus* und *Pribram*, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, 89, 1905. — 3) *Eisler* und *Tsuru*, Zeitschr. f. Immunitforsch. 6, 1910. — 4) *Landsteiner* und *Prasek*, Zeitschrift f. Immunitforsch. 10. — 5) *Eisler*, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, 84, 1910. — 6) *E. Zunz*, Zeitschr. f. Immunitforsch. 19, 1913. — 7) *Hahn* und *Trommsdorf*, Münch. med. Wochenschr. 1900. — 8) *Landsteiner* und *Reich*, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, 89, 1905. — 9) *Aberhalden* und *Fodor*, Fermentforsch. 2, 1919. — 10) *Landsteiner* und *Uhlicz*, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, 40, 1906. — 11) *Doerr* und *Moldovan*, Zeitschr. f. Immunitforsch. 5. — 12) *Bleyer*, Ebendasselbst 33, 1922. — 13) *Kraus* und *Amiradzibi*, Ebendasselbst 6, 1910. — 14) *Graff* und *Menschikoff*, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, 61, 1911.

¹⁾ Ebensowenig vermögen Leberzellen nach Versuchen von *Graff* und *Menschikoff* (14) Pferdeserum bzw. Tetanusantitoxin zu binden.

Beiträge zur Elektroendosmose durch Kohlefilter.

Von

Kojiro Umetsu (Japan).

(Aus dem biochemischen Institut der Vereinigten Fabriken
für Laboratoriumsbedarf in Berlin.)

(Eingegangen am 14. August 1922.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhalt.

1. Zur Theorie der Entstehung der Doppelschicht durch ungleiche Ionenadsorption	442
2. Technik und Theorie der Elektroendosmoseversuche	444
3. Die Ergebnisse der Elektroendosmoseversuche	449
4. Die Versuche mit Sulfosalicylsäure	470
a) Charakterisierung der Sulfosalicylsäure als starke zweibasische Säure	470
b) Vergleich der Adsorption von Sulfosalicylsäure und anderen Säuren durch Blutkohle	472
c) Elektroendosmoseversuche mit Sulfosalicylsäure durch Blutkohlefilter und ihre Deutung	473
5. Über ampholytoide und azidoide Kohlearten	474
6. Über die Adsorptionsaffinität der verschiedenen Kohlearten . . .	476
7. Zusammenfassung	479

1. Zur Theorie der Entstehung der Doppelschicht durch ungleiche Ionenadsorption.

Für die elektrischen Aufladungen von Phasengrenzflächen kommen nach unserer heutigen Vorstellung zwei Ursachen in Betracht, von denen es noch nicht als völlig sicher gelten kann, daß sie in allen Fällen prinzipiell voneinander verschieden seien. Die erste ist das Phasen-

grenzpotential, dessen Theorie von *W. Nernst*¹⁾ zuerst begründet, dann von *F. Haber*²⁾ experimentell und theoretisch bedeutsam bearbeitet und neuerdings von *R. Beutner*³⁾ wesentlich gefördert wurde. Berühren sich zwei Phasen, in denen Elektrolyte gelöst sind, in einer scharfen Grenzfläche, so beobachtet man an dieser Grenzfläche im allgemeinen eine Potentialdifferenz, die auf der Verschiedenheit des Verteilungsgleichgewichtes der Anionen und Kationen eines Elektrolyten zwischen den zwei Phasen beruht. Wenn jede Ionenart einen charakteristischen Teilungskoeffizienten hat, so werden diese Koeffizienten für das positive und das negative Ion eines Elektrolyten im allgemeinen nicht gleich sein. Hierdurch entsteht an der Phasengrenze eine Potentialdifferenz, welche in einem thermodynamisch berechenbaren Zusammenhang mit den elektrolytischen Lösungsdrücken der einzelnen Ionenarten in den einzelnen Phasen steht.

Die andere ist das Adsorptionspotential, über welches *Freundlich*⁴⁾ und *L. Michaelis* gearbeitet haben. Es beruht auf der Verschiedenheit in der Adsorption von Anion und Kation an einer Phasengrenzfläche. Jede Ionenart hat eine eigene Adsorbierbarkeit. Diese ungleiche Adsorption der positiven und negativen Ionen ruft einen Potentialunterschied an der Phasengrenzfläche hervor. Diese Potentialdifferenz äußert sich z. B. bei den Erscheinungen der Endosmose und Katakaphorese.

Handelt es sich um die Berührung einer flüssigen und einer unzweifelhaft festen Phase, so brauchen wir in der Regel nur mit dem Adsorptionspotential zu rechnen. Dies trifft z. B. für den Fall zu, daß die eine Phase Kohle, die andere eine wässrige Lösung ist. Für die Aufladung der Kohle insbesondere hatte *L. Michaelis* der Theorie die Annahme zugrunde gelegt, daß sie auf einer verschiedenen Adsorbierbarkeit der Anionen und Kationen beruht. Die Richtigkeit dieser Grundannahme ist für die Theorie der elektrokinetischen Erscheinungen von so fundamentaler Bedeutung, daß man alle experimentellen Möglichkeiten heranziehen muß, um sie entweder zu sichern oder zu entkräften. Es sollen hier einige Experimente in dieser Richtung beschrieben werden.

¹⁾ *W. Nernst*, Zeitschr. f. physik. Chem. 9, 140, 1892; *Riesenfeld*, Über elektrolytische Erscheinungen und elektromotorische Kräfte an der Grenze zweier Lösungsmittel. Dissertation Göttingen 1901; *Nernst* und *Riesenfeld*, Ann. d. Phys. (4) 8, 600, 1902.

²⁾ *F. Haber*, Ann. d. Phys. (4) 26, 927, 1908; *Haber* und *Klemensiewicz*, Zeitschr. f. physik. Chem. 67, 385, 1909.

³⁾ *R. Beutner*, Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben. Stuttgart 1920.

⁴⁾ *H. Freundlich*, Kapillarchemie, S. 243 ff. Leipzig 1909.

Auf Grund früherer Untersuchungen von *Rona* und *Michaelis*¹⁾ kann man annehmen, daß Kohle so gut wie alle Ionenarten adsorbieren kann, aber in spezifisch verschiedenen Beträgen. Von den gewöhnlichen anorganischen Kationen waren die H-Ionen am stärksten adsorbierbar, von den einfacheren Anionen die OH-Ionen, entsprechend der Tatsache, daß die Mehrzahl der Ionenarten auch chemisch einander in wässriger Lösung nur wenig bindet im Vergleich mit den H- und OH-Ionen, welche nicht nur zueinander, sondern auch gegenüber anderen Ionenarten entgegengesetzter Ladung eine große Affinität zeigen. Blutkohle läßt sich in allen starken Säuren positiv, in allen starken Laugen negativ auf. Daraus darf man schließen, daß im allgemeinen das H-Ion besser adsorbierbar sein wird als das Anion der Säure, und andererseits das OH-Ion besser als das Kation der Base. Sollte sich aber einmal ein Fall zeigen, wo das Anion einer Säure ausnahmsweise eine noch höhere Adsorbierbarkeit hat als das H-Ion, so dürfte sich Kohle durch eine solche Säure nicht positiv aufladen lassen, sondern müßte selbst in stark konzentrierten Lösungen dieser Säure negativ bleiben.

Ich glaube nun einen Fall gefunden zu haben, bei dem eine solche Ausnahme stattfindet, und es wird sich jetzt darum handeln zu zeigen, daß der der obigen Theorie zugrunde liegende Kreis der Beobachtungen und Schlußfolgerungen in sich geschlossen ist. Zweifellos werden sich unter den organischen Substanzen viele solche Säuren finden. Ich möchte jedoch zunächst bei dem einen Fall bleiben und ihn experimentell erschöpfen. Die Säure, an der ich diese Befunde durchgeführt habe, ist die *Sulfosalicylsäure*. Sie bietet den großen Vorteil für die theoretische Behandlung, daß sie wie eine ganz starke Säure total dissoziiert ist und eine Berücksichtigung der undissoziierten Moleküle nicht erfordert, wie weiter unten bewiesen werden wird.

2. Technik und Theorie der Elektroendosmoseversuche.

Für zuverlässige Endosmoseversuche mit Kohlefiltern bedarf es einer ganz besonderen Technik. Von den Apparaturen dazu müssen wir erstens die von *Perrin*²⁾ erwähnen. Sie war für die ersten grundlegenden Versuche nützlich, aber den heutigen Ansprüchen ist sie nicht mehr genügend. Die Apparatur von *Elissajoff*³⁾ ist zu kompliziert und nur für Kapillaren aus durchsichtiger Wand anwendbar und ist

¹⁾ *Rona* und *Michaelis*, diese Zeitschr. 94, 240; 97, 85; 103, 19, 1920; *Michaelis* und *Rona*, Ebendasselbst 94, 225; 97, 57; 102, 268, 1920; Kolloid-Zeitschr. 25, 225, 1919.

²⁾ *Perrin*, Journ. d. chim. phys. 2, 601, 1904.

³⁾ *G. v. Elissajoff*, Zeitschr. f. physik. Chem. 79, 385, 1912.

vielleicht sogar theoretisch nicht ganz einwandfrei¹⁾. *Glizelli*²⁾ hat für gelartige Substanzen eine vorteilhafte Apparatur angegeben. Für lose pulverförmige Membranen, die an der Wand gar nicht festhaften, ist aber seine Methode nicht so leicht anwendbar. *J. Loeb*³⁾ hat mit Kollodiumsäckchen, die er in verschiedenen Eiweißlösungen tränkte, gearbeitet. Es ist jedoch sehr schwer, mit solchen sehr elastischen Säckchen reproduzierbare Werte zu erhalten. Die ausgezeichnete Apparatur von *Bethe* und *Toropoff*⁴⁾ vermeidet zwar diese Übelstände, eignet sich aber im wesentlichen nur für Versuche mit dünnen Membranen, wie z. B. aus Gelatine, aber nicht so gut für pulverförmige Filter. Für diese ist die alte *Perrinsche* Versuchsanordnung, im groben betrachtet, geeigneter, sie hat nur zwei Mängel: erstens arbeitet sie mit Platinelektroden, welche ihrerseits zur Säure- und Alkalibildung Anlaß geben und eine genaue Definierung des p_H während des Versuches unmöglich machen, andererseits entwickeln diese beim Stromdurchgang Gasblasen, welche das Flüssigkeitsniveau nicht nur ruckweise erschüttern, sondern auch durch ihren Gasdruck das Niveau des Steigrohres verändern und die Beobachtung der Endosmose stören. Bei Substanzen mit so geringer endosmotischer Wirkung wie Kohle machen sie die Beobachtung der Endosmose geradezu illusorisch. Der zweite Mangel der *Perrinschen* Apparatur ist, daß man das Kohlepulver in trockenem Zustande in das Rohr einstopfen muß. Die Flüssigkeit, die man späterhin durchtreibt, verändert ihre Zusammensetzung infolge der Adsorption an der Kohle, mit der sie ja zu Anfang des Versuches noch nicht im Adsorptionsgleichgewicht steht. Die in unserem Laboratorium ausgearbeitete Technik von *Gyemant*⁵⁾ vermeidet diese Übelstände besser. Ich habe jedoch, auf Veranlassung und mit Hilfe von Herrn Prof. *L. Michaelis*, noch ein anderes Verfahren ausgearbeitet, welches sich ganz besonders für die Kohle aufs beste bewährt hat.

Der Hauptteil meines Apparates besteht aus einem Glasrohr, einem Filter *a*, das untere Ende ist von einer glockenförmigen Glas-
kuppe umgeben. Das Kohlepulver wird in einer großen Glasflasche mit der zu untersuchenden Flüssigkeit (2 g Kohle auf 500 ccm Flüssigkeit) einige Minuten geschüttelt, einen Tag stehen gelassen. Das breiige Sediment wird in das verengte Rohr *b* eingefüllt, dessen unteres Ende

¹⁾ Die unten zitierte Arbeit von *Kruyt*.

²⁾ *S. Glizelli*, Bull. d. l'Acad. d. Sciences d. Craovie, Serie A, Heft vom April/Juni 1917, S. 102.

³⁾ *J. Loeb*, Journ. of gen. physiol. 1 und 2, 1919–1920.

⁴⁾ *A. Bethe* und *Th. Toropoff*, Zeitschr. f. physik. Chem. 88, 686, 1914 und 89, 597, 1915.

⁵⁾ *A. Gyemant*, Kolloid-Zeitschr. 28, 3, 1921.

zunächst mit Gaze umbunden ist, dann wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe die Kohle in dem verengten Rohre *b* zu einem soliden Zylinder zusammengesaugt, indem von dem Kohlebrei immer neu aufgegossen wird. Nach genügender Filtrationszeit ist die Kohlensäule so fest geworden, daß man den Gazeverschluß abnehmen kann. Nunmehr wird der ganze Apparat, wie in der Abbildung angegeben, zusammengesetzt. Das Gefäß *h* wird mit der Flüssigkeit gefüllt, mit welcher die Kohle in Adsorptionsgleichgewicht versetzt worden war. Der Raum *a*, ebenfalls das Rohr *d* ist durch einen Gummischlauch mit dem fast horizontal liegenden Steigrohr *i* verbunden. Als solches dient eine kapillare gradierte Pipette von 0,1 cm, geteilt in tausendstel Kubikzentimeter. Die luftblasenfreie Auffüllung des Raumes *a* wird durch Ansaugen vermittelt des mit Glashahn versehenen Stutzens *c* erleichtert. *f* und *e* sind Glasrohre, gefüllt mit 3proz., mit KCl gesättigter Agargallerte. Die unteren Enden beider Rohre sind nach

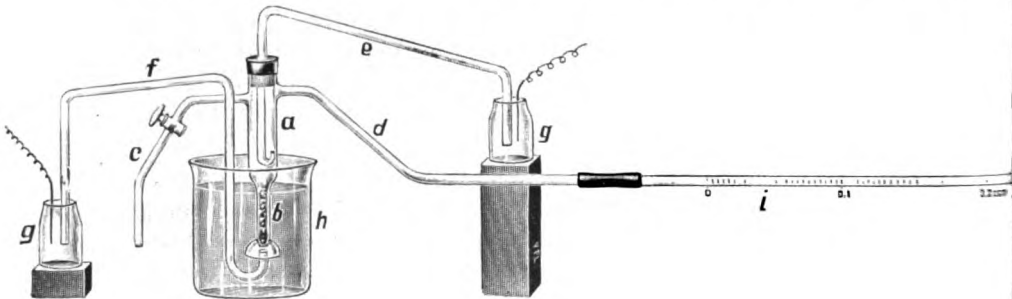


Abb. 1.

oben umgebogen, um ein Herabsinken der herausdiffundierenden stärkeren KCl-Lösung zu verhindern. Die anderen Enden der Agarrohre tauchen in eine 10proz. Kupfersulfatlösung, in welcher Kupferdrähte als Elektroden stecken. Vor der Geschwindigkeitsablesung muß das Niveau im großen Gefäß und im Steigrohr so beschaffen sein, daß ohne Anlegung eines äußeren elektrischen Feldes keine Wasserbewegung stattfindet. Dann wurde der Strom geschlossen, jede Minute abgelesen und die Stromrichtung alle 3 Minuten umgekehrt. Der Strom wurde der Lichtleitung *v* (220 Volt) entnommen und mit Hilfe einer Schalttafel reguliert, sowie ein Stromwender eingeschaltet. Die Spannung wurde bei den verschiedenen Versuchen zu 50, 100, gelegentlich auch zu 200 Volt gewählt; diese Spannung fiel über die Länge einer Kohlensäule von 5 cm ab. Besonders bei besser leitenden Flüssigkeiten mußte man sich auf die niedrigeren Spannungen beschränken, weil bei stärkeren Stromstärken von 0,02 Amp. und darüber störende Erscheinungen eintreten. Es zeigt sich *Joulesche Wärme*, die man

daran erkennt, daß bei der Stromwendung die Geschwindigkeit der Niveauänderung nicht völlig reversibel ist, nicht symmetrisch erfolgt, sondern eine einseitige Komponente zeigt, die auf die Wärmeausdehnung der Flüssigkeit bezogen werden kann. Bei hohen Stromstärken entstehen auch häufig Gasblasen im Innern der Kohlensäule, die wahrscheinlich aus der Verunreinigung mit irgend einem leitenden Gebilde herrühren, welches als Mittelleiter wirkt. Da Kohle als ein guter metallischer Leiter gilt, ist es eigentlich zu verwundern, daß sie erstens überhaupt einen endosmotischen Effekt gibt, denn Endosmose kann nur eintreten, wenn die Wasserteilchen unmittelbar kathodenwärts von jedem Kohleteilchen einen Potentialunterschied gegen die Wasserteilchen unmittelbar anodenwärts von jedem Kohleteilchen zeigen, sobald das äußere Stromfeld angelegt wird. Ist aber das feste Teilchen von wesentlich größerer Leitfähigkeit als die Lösung, so kann das Kathodenende eines jeden Teilchens gegen das Anodenende keinen merklichen Potentialunterschied zeigen. Zweitens ist es zu verwundern, daß die Gasbildung erst bei so hohen Stromstärken eintritt. Tatsache ist jedenfalls, daß in Kohlefiltern eine Elektroendosmose stattfindet. Die Geschwindigkeit der Endosmose in Kohlefiltern ist zwar bedeutend geringer als die z. B. in Kaolinfiltern in dem gleichen Apparat. Aber man kann vorläufig nicht recht beurteilen, ob dieser Unterschied auf einer geringeren Größe des Wandpotentials oder auf einer Schwächung des äußeren elektrischen Feldes durch die eigene Leitfähigkeit des Pulvers beruht. Es ist sehr fraglich, ob die Leitfähigkeit eines Präparates wie Blutkohle von gleicher Größenordnung wie die bekannte Leitfähigkeit der Retortenkohle ist. Solange wir hierüber nichts wissen, ist es nicht möglich, aus der Größe der endosmotischen Verschiebung unter Anwendung der *Helmholtz-Perrinschen* Formel die absolute Größe des Wandpotentials zu berechnen. Was die relativen Werte bei Änderung der äußeren Spannung betrifft, so konnten wir stets bestätigen, daß die endosmotische Verschiebung proportional der angelegten äußeren Spannung ist.

Aber nicht nur diese eben erwähnten Umstände verhindern uns, aus der endosmotischen Verschiebung vermittelt der *Helmholtzschen* Formel die absolute Größe des Wandpotentials zu berechnen. Wenn wir nämlich die in der letzten Zeit entwickelten Anschauungen über die Endosmose zugrunde legen, so müssen wir als treibende Kraft der ganzen Bewegung den tangential zu der festen Kohlewand gerichteten Zug des elektrischen Feldes auf die in das Wasser ragende *bewegliche* Hälfte der elektrischen Doppelschicht betrachten. Das materielle Substrat der adhärennten, nicht beweglichen Schicht sind die gut adsorbierbaren Ionen des gelösten Elektrolyten; das Substrat der beweglichen Schicht sind die schlecht adsorbierbaren Ionen. An letztere

greift der Zug des elektrischen Feldes an; das Wasser wird von diesem mitgeschleppt, weil jedes sich bewegende Ion in wässriger Lösung Wasser mitschleppt. Die Menge des mitgeschleppten Wassers hängt somit nicht allein von der Potentialdifferenz oder der Dichte der Doppelschicht, sondern auch von dem Wasserbindungsvermögen der in Bewegung gesetzten Ionen ab. Ein gar nicht hydratisiertes Ion würde, wenn es durch ein äußeres elektrisches Feld in Bewegung gesetzt wird, überhaupt kein Wasser mitschleppen und daher auch keine Elektroendosmose erzeugen, sondern im höchsten Falle unter günstigsten Bedingungen (zu welchen unter anderem eine minimale Porenweite des Filters gehört) nur die von *Bethe* und *Toropoff* beschriebene „Konzentrationsstörung“ hervorrufen.

Ich habe es deshalb vermieden, aus der Größe der endosmotischen Störungen die Wandpotentiale zu berechnen, und habe die Methode gewissermaßen nur als eine 0-Methode benutzt, d. h. es wurde immer nur diejenige Zusammensetzung der Flüssigkeit aufgesucht, bei der der Wassertransport verschwindet bzw. seine Richtung umkehrt; in diesem Falle durften wir das Wandpotential Null setzen.

Zwar wurde von *Bethe* und *Toropoff* nachgewiesen, daß nicht einmal diese Annahme ganz exakt ist. Sie zeigten, daß der Indifferenzpunkt der Wasserbewegung nicht genau zusammenzufallen braucht mit dem isoelektrischen Punkt der Wand, weil selbst bei Abwesenheit jeder endosmotischen Wasserverschiebung eine Wasserverschiebung infolge der verschiedenen Hydratation der *in Lösung* befindlichen Ionen stattfindet. Was in den früheren Forschungen bei der Elektrolyse und Ionenbeweglichkeit sich als Konzentrationsänderung, als Ausdruck der Verschiedenheit der Überföhrungszahlen von Anion und Kation äußerte, dasselbe muß sich bei Einschaltung eines engporigen Filters, welcher die Ausbildung hydrostatischer Druckunterschiede zuläßt, als Wasserverschiebung äußern. Daher ist der isoelektrische Punkt streng genommen nicht identisch mit dem Indifferenzpunkt der Wasserbewegung in einem Diaphragma. Jedoch sind diese Unterschiede auf alle Fälle nur als klein zu veranschlagen, und um uns eine Vorstellung davon zu machen, einen wie großen Fehler wir wohl durch die Vernachlässigung dieses Ergebnisses machen würden, stellten wir die folgenden Versuche an, und zwar:

In einer ersten Versuchsreihe wurde Blutkohle mit HCl-Lösungen variierter Konzentrationen behandelt und diejenige Konzentration aufgesucht, welche dem Indifferenzpunkt der Elektroendosmose entsprach. In einer zweiten Versuchsreihe wurde dasselbe wiederholt, die verschiedenen Lösungen aber mit einem konstanten Überschuß von KCl versetzt und wiederum der Indifferenzpunkt der Endosmose aufgesucht. Dieser ergab sich für beide Versuchsreihen in nicht unter-

scheidbarer Weise bei $p_H = 3,0$. Nun sind die Bedingungen dafür, daß der Indifferenzpunkt und der wahre isoelektrische Punkt möglichst verschieden voneinander seien, in dem Versuch mit reiner HCl möglichst groß, weil der Unterschied in den Wanderungsgeschwindigkeiten des H- und des Cl-Ions sehr groß ist; in dem Versuch mit überschüssigem KCl sind diese Bedingungen möglichst ungünstig, weil K und Cl die gleichen Wanderungsgeschwindigkeiten (Hydratation) haben. Nach der Theorie von *Bethe* und *Toropoff* kann nämlich ein Unterschied des Indifferenzpunktes der Endosmose vom isoelektrischen Punkt nur hervortreten bei merklicher Ungleichheit der Hydratation von Anion und Kation. Da nun der Zusatz von KCl den Indifferenzpunkt nicht verschob, folgt daraus, daß bei unseren Versuchsbedingungen auch bei reinen HCl-Lösungen ein *praktisch bemerkbarer* Unterschied zwischen Indifferenzpunkt der Endosmose und isoelektrischem Punkt der Diaphragmasubstanz nicht besteht. Wir sind daher berechtigt, den von uns beobachteten Indifferenzpunkt innerhalb der Fehlergrenzen der Versuchsanordnung als praktisch gleich dem isoelektrischen Punkt zu betrachten.

8. Die Ergebnisse der Elektroendosmoseversuche.

Auf dem Boden der oben entwickelten Theorie stehend, habe ich mit meinem Apparat die folgenden Endosmoseversuche angestellt, von denen die ersten nur zur Orientierung dienten, ob die Methode an gut ausstudierten Objekten die zu erwartenden Resultate gab.

1. *Gelatine mit Essigsäure und Natriumacetat* (s. weiter unten das Protokoll). Bei diesem Versuche ist die Gelatine negativ geladen, und es zeigte sich fast gleichmäßige regelmäßige Geschwindigkeit, welche bei Stromwendung quantitativ umkehrte.

2. *Kaolin mit Aqua dest. und n/100 NaOH*. In diesem Falle war das Diaphragma auch negativ geladen und zeigte beiderseits (besonders bei Kaolin: Aqua dest.) gleichmäßige regelmäßige und bedeutende Geschwindigkeit der Wasserbewegung, bei Stromwendung quantitativ umkehrend.

3. *Blutkohle mit n/100 NaOH*. Hier zeigte sich, daß das Kohlendiaphragma negativ geladen war. Die Geschwindigkeit nach rechts und links war verschieden, aber auf jeder Seite für sich gleichmäßig. (Wirkung der zu großen Stromstärke, der *Jouleschen* Wärme.)

4. *Blutkohle mit HCl*. Hierbei konnte ich feststellen, daß das Kohlendiaphragma bei n/100, n/300 (p_H 2,663), n/500 (p_H 2,958) und n/600 (p_H 3,0) HCl positiv, bei n/700 (p_H 3,1), n/800 (p_H 3,4), n/1000 (p_H 3,5) und n/10000 HCl negativ geladen war.

Ich habe oftmals die Versuche für den Umladungspunkt ausgeführt, aber die Resultate waren immer die gleichen. Das angegebene p_H ist das p_H des Filtrats der mit Kohle behandelten Säure. (Z. B.: Kohle 2,0 g, HCl-Lösung 500,0 ccm, einige Minuten stark umgeschüttelt, einen ganzen Tag stehengelassen und dann filtriert.) Die p_H -Bestimmung wurde im allgemeinen mit der Indikatorenmethode von *L. Michaelis*¹⁾ ausgeführt, die wichtigen p_H -Messungen in der Nähe des elektrischen Umkehrpunktes *außerdem* stets elektrometrisch festgestellt, die Resultate mit beiden Methoden waren praktisch stets identisch.

5. *Blutkohle mit Salzsäure und Kaliumchlorid.* Als Salzsäure benutzte ich n/100, n/400, n/500 und n/700 Lösung und setzte KCl so zu, daß es in der Lösung als n/10 Lösung vorhanden war. Dabei wurde HCl viel stärker als ohne KCl-Zusatz von der Kohle adsorbiert²⁾. Deshalb war der Umladungspunkt ein anderer, von der Konzentration der benutzten HCl aus betrachtet. Sehen wir ihn aber als durch p_H bestimmt an, so ist er derselbe wie bei Anwesenheit von HCl allein, nämlich bei n/100 (p_H 2,21) und n/400 (p_H 2,925) war das Kohlendiaphragma positiv, aber bei n/500 (p_H 3,08) und n/700 (p_H 3,47) negativ geladen.

Bei den Versuchen mit HCl allein sowohl als auch bei denen mit HCl + KCl war natürlich jedesmal in der Nähe des Umladungspunktes die Geschwindigkeit sehr träge, aber ich konnte sie doch noch ganz genau beobachten. Wir können also sagen, daß der Umladungspunkt bei dem Versuche mit Blutkohle und HCl und bei dem mit Blutkohle und HCl + KCl bei $p_H = 3,0$ liegt. Wenn p_H kleiner als 3,0 wird, ist das Kohlendiaphragma positiv, und wenn p_H größer als 3,0 wird, negativ geladen. Ich konnte also mit diesem Apparat viel schärfer, als meine Vorgänger Grenzen für den Umladungspunkt feststellen.

6. *Blutkohle mit Schwefelsäure.* Bei diesem Versuche war die Geschwindigkeit viel träger als bei dem Versuche mit HCl. Trotzdem konnte ich den Umladungspunkt ziemlich scharf abgrenzen. Mein Versuch zeigte, daß das Kohlendiaphragma bei n/100 (p_H 2,238) und n/400 (p_H 2,919) positiv, bei n/500 (p_H 3,06) und n/600 (p_H 3,20) keine Bewegung, bei n/700 (p_H 3,3) und n/10000 (p_H 6,39) negativ geladen war. Nach diesen Resultaten kann man annehmen, daß der Umladungspunkt des Kohlendiaphragmas bei dem Versuche mit Schwefelsäure ebenfalls $p_H = 3,0$ ist.

¹⁾ *L. Michaelis*, Deutsche med. Wochenschr. Nr. 17, 1921; Zeitschr. f. Immunforschung **32**, 194, 1921.

²⁾ *Rona* und *Michaelis*, diese Zeitschr. **97**, 85, 1919.

7. *Blutkohle mit Sulfosalicylsäure.* Zu diesem Versuche habe ich 0,0034proz. (p_H 4,0), 0,0332proz. (p_H 3,5), 0,1proz. (p_H 2,613), 1proz. (p_H 1,42) und 2proz. (p_H 1,15) Lösung benutzt. Dieser Versuch zeigt, daß das Kohlendiaphragma in Lösung von Sulfosalicylsäure immer negativ geladen ist; das Potential wird zwar mit Verkleinerung von p_H auch immer kleiner, aber die Kohle niemals umgeladen.

8. *Zuckerkohle und Salzsäure.* Bei dem Versuche mit Blutkohle und HCl sahen wir, daß das Kohlendiaphragma für p_H kleiner als 3,0 positiv, für p_H größer als 3,0 negativ geladen war. Ein Diaphragma aus Zuckerkohle zeigte dagegen immer negative Ladung. In diesem Falle wurde das Potential zwar auch mit Abnahme von p_H kleiner, aber niemals wurde das Diaphragma umgeladen. Das Wasser bewegte sich nämlich beim Versuche mit $n/100$ (p_H 2,011), $n/1000$ (p_H 3,245), $n/10000$ (p_H 6,373) immer nach der Kathode. Die Geschwindigkeit war viel größer als beim Versuche mit Blutkohle.

9. *Zuckerkohle und $n/100$ KOH.* Das Kohlendiaphragma war auch in diesem Falle negativ geladen.

10. *Zucker- K_2CO_3 -Kohle mit $n/1000$ HCl.* Auch bei diesem Versuche bewegte sich das Wasser nach der Kathode.

11. *Benzoessäure- K_2CO_3 -Kohle mit HCl.* Auch bei diesem Versuche bewegte sich das Wasser kathodenwärts.

„Blutkohle“ bedeutet hier das *Mercksche* Präparat; „Zuckerkohle“ war ein durch Verkohlen von Rohrzucker selbst hergestelltes Präparat; „Zucker- K_2CO_3 -Kohle“ bedeutet eine Kohle, aus einem Gemisch von Zucker und K_2CO_3 durch Verkohlung dargestellt und vollständig alkalifrei gewaschen wurde. In der gleichen Weise wurde nach dem Vorschlag von *O. Warburg* die „Benzoessäure- K_2CO_3 -Kohle“ hergestellt.

Die Bedeutung der Protokolle ist folgende: Nach jedem Horizontalstrich (w) wurde der Strom gewendet. In der ersten Spalte ist die Zeit angegeben, in der zweiten der Wasserstand in dem (fast horizontalen) Steigrohr (Ablesung der cbmm-Teilung der Pipette; 1 Teilstrich = 0,001 cbmm), in der dritten die Veränderung des Wasserstandes, über der dritten Spalte ist die Richtung der Wasserbewegung in bezug auf die äußeren Elektroden notiert.

I. Versuche mit Gelatine und Acid. acet.

Gelatine mit n-Acid. acet. (2,0) — n-Nat. acet. (20,0) — Lösung
(Aqua dest. 600,0) *p*. 5,6. — (w bedeutet Stromwendung.)

Zeit			Volt	Amperè
2h 1'	0,0511	nach der Kathode*	200	—
	— w			
2	0,0492			
3	0,0467	— 0,0068		—
4	0,0443			
	— w			
5	0,0461			
6	0,0495	+ 0,0088		
7	0,0531			
	— w			
8	0,0515			
9	0,0488	— 0,0067		—
10	0,0464			
	— w			
11	0,0490			
12	0,0523	+ 0,0095		
13	0,0599			
	— w			
14	0,0535			
15	0,0505	— 0,0082		—
16	0,0477			
	— w			
17	0,0501			
18	0,0535	+ 0,0095		—
19	0,0570			

II. Versuche mit Kaolin.

1. Kaolin mit Aqua destillata. — Länge der Kaolinsäule 4,0 cm.

Zeit			Volt	Amperè
9h 52'	0,0060	nach der Kathode	50	—
	— w			
53	0,0105			0,0018
54	0,0158	+ 0,0148		0,0018
55	0,0208			0,0018
	— w			
56	0,0165			0,0018
57	0,0121	— 0,0131		0,0018
58	0,0077			0,0018
	— w			
59	0,0127			0,0019
60	0,0179	+ 0,0155		0,0019
10h 1'	0,0238			0,0019
	— w			
2	0,0188			0,0019
3	0,0142	— 0,0139		0,0020
4	0,0093			0,0020
	— w			

Versuche mit Kaolin. (Fortsetzung.)

Zeit			Volt	Ampère
10h 5'	0,0150	Kathode	50	0,0021
6	0,0225	+ 0,0148		0,0020
7	0,0241			0,0020
	— ^w			
8	0,0209			0,0019
9	0,0160	— 0,0129		0,0019
10	0,0112			0,0019
	— ^w			
33	0,0400	Kathode	100	—
	— ^w			
34	0,0290			0,0039
35	0,0175	— 0,0345		0,0039
36	0,0055			0,0039
	— ^w			
37	0,0180			0,0043
38	0,0280	0,0357		0,0043
39	0,0412			0,0043
	— ^w			
40	0,0298			0,0040
41	0,0175	— 0,0347		0,0040
42	0,0065			0,0040
	— ^w			
43	0,0185			0,0043
44	0,0313	0,0367		0,0043
45	0,0432			0,0043
	— ^w			
46	0,0320			0,0040
47	0,0195	— 0,0362		0,0040
48	0,0070			0,0040
	— ^w			
49	0,0195			0,0042
50	0,0320	0,0370		0,0042
51	0,0440			0,0042
	— ^w			
11h 23'	0,0110	Kathode	200	—
	— ^w			
24	0,0405			0,009
25	0,0723	+ 0,0613		0,009
	— ^w			
26	0,0400			0,009
27	0,0120	— 0,0603		0,009
	— ^w			
28	0,0410			0,009
29	0,0735	+ 0,0605		0,009
	— ^w			
30	0,0425			0,009
31	0,0140	— 0,0590		0,009
	— ^w			
32	0,0435			0,009
33	0,0745	+ 0,0605		0,009
	— ^w			
34	0,0461			0,009
35	0,0142	— 0,0603		0,009

Versuche mit Kaolin. (Fortsetzung.)

2. Kaolin mit n/100 NaOH. Länge der Kaolinsäule 5,5 cm.

Zeit			Volt	Ampère
1h 40'	0,0498 — ^w	Kathode	50	—
41	0,0477			0,0029
42	0,0456	— 0,0060		0,0029
43	0,0438 — ^w			0,0029
44	0,0455			0,00295
45	0,0483	+ 0,0077		0,00295
46	0,0515 — ^w			0,00295
47	0,0493			0,00295
48	0,0471	— 0,0060		0,0029
49	0,0455 — ^w			0,0029
50	0,0479			0,0029
51	0,0503	+ 0,0078		0,0029
52	0,0532 — ^w			0,0029
2h 4'	0,0550 — ^w	Kathode	100	—
5	0,0498			0,0069
6	0,0465	— 0,0112		0,0069
7	0,0438 — ^w			0,0069
8	0,0475			0,0069
9	0,0515	+ 0,0141		0,0069
10	0,0579 — ^w			0,0070
11	0,0539			0,0070
12	0,0506	— 0,0109		0,0070
13	0,0472 — ^w			0,0070
14	0,0512			0,0070
15	0,0552	+ 0,0131		0,00705
16	0,0603 — ^w			0,00705
17	0,0560			0,0071
18	0,0530	— 0,0108		0,0070
19	0,0495 — ^w			0,0070
20	0,0533			0,0071
21	0,0575	+ 0,0130		0,0071
22	0,0625 — ^w			0,0071
32	0,0382 — ^w	Kathode	220	—
33	0,0498			0,020
34	0,0655	+ 0,0418		0,020
35	0,0800 — ^w			0,020

Versuche mit Kaolin. (Fortsetzung.)

Zeit			Volt	Ampère
2h 36'	0,0688	Kathode	220	0,021
37	0,0595	— 0,0308		0,021
38	0,0492			0,021
	—w			
39	0,0610			0,021
40	0,0765	+ 0,0418		0,023
41	0,0910			0,023
	—w			
42	0,0882			0,023
43	0,0680	— 0,0335		0,023
44	0,0575			0,022
	—w			
45	0,0692			0,022
46	0,0845	+ 0,0425		0,022
47	0,0998			0,022
	—w			
48	0,0860			0,022
49	0,0756	— 0,0366		0,022
50	0,0632			0,022

III. Versuche mit Blutkohle und Natronlauge.

Blutkohle 2,0: n/100 NaOH 500,0. Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit			Volt	Ampère
0h 12'	0,0495	nach der Kathode	50	—
	—w			
13	0,0524			0,009
14	0,0555	+ 0,0082		0,009
15	0,0577			0,009
	—w			
16	0,0567			0,009
17	0,0555	— 0,0029		0,008
18	0,0548			0,008
	—w			
19	0,0570			0,008
20	0,0600	+ 0,0082		0,009
21	0,0630			0,009
	—w			
22	0,0619			0,008
23	0,0608	— 0,0028		0,008
24	0,0602			0,008
	—w			
25	0,0625			0,008
26	0,0651	+ 0,0081		0,008
27	0,0683			0,008
	—w			
28	0,0674			0,008
29	0,0666	— 0,0028		0,008
30	0,0655			0,008

Versuche mit Blutkohle und Natronlauge. (Fortsetzung.)

Zeit			Volt	Ampère
11 ^h 11'	0,0359 -----w	Kathode	100	—
12	0,0420			0,019
13	0,0476	+ 0,0179		0,019
14	0,0538 -----w			0,020
15	0,0529			0,020
16	0,0500	— 0,0053		0,020
17	0,0485 -----w			0,020
18	0,0528			0,018
19	0,0592	+ 0,0135		0,019
20	0,0680 -----w			0,019
21	0,0670			0,018
22	0,0635	— 0,0058		0,018
23	0,0622 -----w			0,018
24	0,0650			0,015
25	0,0707	+ 0,0167		0,017
26	0,0789 -----w			0,017
27	0,0765			0,015
28	0,0742	— 0,0051		0,013
29	0,0738			0,013

IV. Versuche mit Blutkohle und Salzsäure.

1. Blutkohle 2,0: n/100 HCl 500,0. Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit			Volt	Ampère
11 ^h 0'	0,0386 -----w	nach der Anode	50	—
1	0,0398			0,014
2	0,0390	+ 0,0005		0,014
3	0,0391 -----w			0,013
4	0,0383			0,013
5	0,0387	— 0,0004		0,014
6	0,0387 -----w			0,014
7	0,0388			0,014
8	0,0390	+ 0,0004		0,014
9	0,0391 -----w			0,013
10	0,0388			0,014
11	0,0388	— 0,0005		0,014
12	0,0386			0,014

Versuche mit Blutkohle und Salzsäure. (Fortsetzung.)

Zeit			Volt	Ampère
11h29'	0,0416 — ^w	nach der Anode	100	—
30	0,0426	+ 0,0019		0,025
31	0,0435 — ^w			
32	0,0431	— 0,0006		0,026
33	0,0429 — ^w			0,026
34	0,0439	+ 0,0021		0,026
35	0,0450 — ^w			0,026
36	0,0448	— 0,0006		0,025
37	0,0444 — ^w			0,027
38	0,0456	+ 0,0021		0,027
39	0,0465 — ^w			0,025
40	0,0462	— 0,0006		0,026
41	0,0459			0,026

Auch bei den folgenden Versuchen habe ich wie oben jedesmal die Beobachtung in jeder Minute ausgeführt, aber der Raumersparnis wegen teile ich nur die Summe der Wasserbewegung in drei Minuten (ausnahmsweise in 1 oder 2 oder 5 Minuten) mit.

2. Blutkohle 2,0: n/300 HCl 500,0. p_H 2,663.
Länge der Kohlsäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Anode		
12h30—33'	+ 0,0007	50	0,014
— ^w			
33—36	— 0,0003		0,014
— ^w			
36—39	+ 0,0007		0,014
— ^w			
39—42	— 0,0003		0,014
— ^w			
	Anode		
48—51	+ 0,0010	70	0,019
— ^w			
51—54	— 0,0004		0,0185
— ^w			
54—57	+ 0,0010		0,019
— ^w			
57—60	— 0,0004		0,0195
— ^w			

2. Blutkohle. (Fortsetzung.)

Zeit		Volt	Amperè
	Anode		
1h 18—21	+ 0,0015	100	0,029
21—26 ^w	— 0,0003		0,026
24—27 ^w	+ 0,0015		0,029
27—30 ^w	+ 0,0003		0,028

3. Blutkohle 2,0: n/500 HCl 500,0. p_H 2,936 (kolorimetrisch 2,9).
Länge der Kohlsäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Amperè
	Anode		
9h 44—47'	+ 0,0005	50	0,013
47—50 ^w	— 0,0004		0,013
50—53 ^w	+ 0,0004		0,013
53—56 ^w	— 0,0004		0,013
	Anode		
59— 2 ^w	— 0,0004	70	0,018
10h 2— 5 ^w	+ 0,0005		0,018
5— 8 ^w	— 0,0004		0,017
8—11 ^w	+ 0,0004		0,0175

also in Wirklichkeit fast Stillstand.

4. Blutkohle 2,0: n/600 HCl 500,0. p_H 3,0.
Länge der Blutkohle 5,0 cm.

Zeit		Volt	Amperè
	Anode		
10h 55—60'	+ 0,0002	50	0,0085
11h 1— 5 ^w	+ 0		0,0045
5—10 ^w	+ 0,0002		0,0093
10—15 ^w	— 0,0001		0,0080

also hier auch in Wirklichkeit Stillstand.

5. Blutkohle 2,0 : n/700 HCl 500,0. p_H 3,1.

Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
11h 36—39'	+ 0,0004	50	0,01
— w			
39—42	— 0,0003		0,01
— w			
42—45	+ 0,0003		0,01
— w			
45—48	— 0,0003		0,01
— w			
	Kathode		
12h 38—41	+ 0,0008	100	0,016
— w			
41—46	— 0,0013		0,017
— w			
46—51	+ 0,0024		0,017
— w			
51—56	— 0,0035		0,017
— w			
56—1	+ 0,0012		0,016
— w			
1—6	— 0,0038		0,0155
— w			

6. Blutkohle 2,0 : n/800 HCl 500,0. p_H 3,4.

Länge der Kohlensäule 5,5 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
12h 0—3'	— 0,0001	50	0,0090
— w			
3—6	+ 0,0001		0,009
— w			
6—9	— 0,0001		0,009
— w			
9—12	+ 0,0001		0,009
— w			
	Kathode		
10h 55—58	— 0,0023	100	0,018
— w			
58—1	+ 0,0025		0,019
— w			
12h 15—18	— 0,0023		0,018
— w			
18—21	+ 0,0038		0,018
— w			

7. Blutkohle 2,0: n/1000 HCl 500,0. p_H 3,5.

Länge der Kohlensäule 4,2 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
11 ^b 57—60'	+ 0,0350	220	0,008
— w			
60— 3	— 0,0145		
— w			
3— 6	+ 0,0323		
— w			
6— 9	— 0,0115		
— w			

8. Blutkohle 2,0: n/10000 HCl 500,0.

Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
10 ^b 34—37'	— 0,0002	50	0,008
— w			
37—40	+ 0,0022		0,0077
— w			
40—43	— 0,0002		0,0065
— w			
43—46	+ 0,0022		0,0074
— w			
46—49	— 0,0002		0,0067
— w			
49—52	+ 0,0021		0,0072
— w			
	Kathode		
11 ^b 2— 5	+ 0,0034	100	0,013
— w			
5— 8	— 0,0006		0,011
— w			
8—11	+ 0,0038		0,013
— w			
11—14	— 0,0004		0,013
— w			
14—17	+ 0,0047		0,013
— w			
17—20	— 0,0006		0,013
— w			

V. Versuche mit Blutkohle, Salzsäure und Kaliumchlorid.

1. Blutkohle 2,0: n/100 HCl 500,0 mit n/10 KCl. p_H 2,21.

Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Amperé
	Anode		
10h 31—34'	+ 0,0011	70	0,016
— w			
34—37	— 0,0003		0,014
— w			
37—40	+ 0,0009		0,014
— w			
40—43	— 0,0004		0,012
— w			

2. Blutkohle 2,0: n/400 HCl 500,0, mit n/10 KCl. p_H 2,925

(kolorimetrisch 2,9). Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Amperé
	Anode		
1h 38—41'	— 0,0008	50	0,0078
— w			
41—44	+ 0,0003		0,0095
— w			
44—47	— 0,0006		0,0080
— w			
47—50	+ 0,0002		0,0096
— w			
	Anode		
2h 8—11	— 0,0003	100	0,014
— w			
11—14	+ 0,0017		0,020
— w			
14—17	— 0,0003		0,015
— w			
17—20	+ 0,0012		0,015
— w			
	Anode		
2h 23—26	+ 0,0103	200	sehr schwankend
— w			0,007—0,04
26—29	— 0,0105		0,007—0,08
— w			

3. Blutkohle 2,0: n/500 HCl 500,0, mit n/10 KCl. p_H 3,08
(kolorimetrisch 3,1). Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit	*	Volt	Ampère
	Kathode		
10h 48—51'	— 0,0002	70	0,017
— w			
51—54	+ 0,0005		0,017
— w			
54—57	— 0,0002		0,017
— w			
57—60	+ 0,0005		0,016
— w			
	Kathode		
11h 7—10	+ 0,0006	100	0,023
— w			
10—13	— 0,0005		0,023
— w			

4. Blutkohle 2,0: n/700 HCl 500,0, mit n/10 KCl. p_H 3,47
(kolorimetrisch 3,5). Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
1h 54—57'	— 0,0012	70	0,014
— w			
57—60	+ 0,0006		0,014
— w			
2h 0—3	— 0,0006		0,015
— w			
3—6	+ 0,0005		0,014
— w			
6—9	— 0,0008		0,014
— w			
	Kathode		
2h 31—34	+ 0,0058	100	0,022
— w			
34—37	— 0,0020		0,023
— w			
37—40	+ 0,0024		0,022
— w			
40—43	— 0,0015		0,022
— w			

VI. Versuche mit Blutkohle und Schwefelsäure.

1. Blutkohle 2,0: n/100 H_2SO_4 500,0. p_{H} 2,238.

Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Anode		
12 ^h 15—18'	— 0,0001	70	0,004
— w			
18—21	+ 0,0002		0,004
— w			
	Anode		
56—59	+ 0,0008	100	0,015
— w			
59—2	— 0,0003		0,0165
— w			
1 ^h 2—5	+ 0,0005		0,011
— w			
5—8	— 0,0002		0,0165
— w			
	Anode		
8—11	+ 0,0031	150	0,033
— w			
11—14	— 0,0009		0,023
— w			
14—17	+ 0,0022		0,026
— w			

2. Blutkohle 2,0: n/400 H_2SO_4 500,0. p_{H} 2,919 (kolorimetrisch 2,9).

Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Anode		
11 ^h 9—12'	+ 0,0002	50	0,0085
— w			
12—15	— 0,0001		0,0085
— w			
15—18	+ 0,0002		0,0085
— w			
18—21	— 0,0002		0,0085
— w			
	Anode		
22—25	+ 0,0003	70	0,0125
— w			
25—28	— 0,0002		0,012
— w			
28—31	+ 0,0001		0,012
— w			
31—34	— 0,0002		0,012
— w			

3. Blutkohle 2,0: n/500 H_2SO_4 500,0. p_{H} 3,06 (kolorimetrisch 3,0).

Keine Wasserbewegung.

4. Blutkohle 2,0: n/600 H_2SO_4 500,0. p_{H} 3,204 (kolorimetrisch 3,2).

Keine Wasserbewegung.

5. Blutkohle 2,0: n/700 H_2SO_4 500,0. p_{H} 3,41 (kolorimetrisch 3,3).
Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
11h 50—53'	+ 0,0003	50	0,012
— w			
53—56	— 0,0001		0,012
— w			
56—59	+ 0,0004		0,012
— w			
69— 2	— 0,0001		0,012
— w			
	Kathode		
12h 8—11	+ 0,0004	70	0,0165
— w			
11—14	— 0,0003		0,0175
— w			
14—17	+ 0,0005		0,0175
— w			
17—20	— 0,0002		0,017
— w			
20—23	+ 0,0004		0,017
— w			
23—26	— 0,0003		0,017
— w			

6. Blutkohle 2,0: n/10000 H_2SO_4 500,0. p_{H} 6,394 (kolorimetrisch 6,4).
Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
1h 33—36'	— 0,0011	50	0,011
— w			
36—39	+ 0,0023		0,01
— w			
39—42	— 0,0012		0,01
— w			
42—45	+ 0,0022		0,01
— w			
	Kathode		
54—57	+ 0,0041	70	0,012
— w			
57—60	— 0,0011		0,013
— w			
2h 1— 3	+ 0,0042		0,0125
— w			
3— 6	— 0,0011		0,012
— w			

VII. Versuche mit Blutkohle und Sulfosalicylsäure.

1. Blutkohle 2,0: 0,0034proz. Sulfosalicylsäure 500,0. p_H 4,0.

Länge der Blutkohle 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
11 ^h 50—55'	Kathode + 0,0016	50	0,008 — 0,0078
— w			
55—60	— 0,0017		0,0094—0,0068
— w			
12 ^h 1—5	+ 0,0015	100	0,0079—0,0069
— w			
5—10	— 0,0017		0,0086—0,0064
— w			
25—28	Kathode — 0,0039		0,018—0,012
— w			
28—31	+ 0,0030		0,013
— w			
31—34	— 0,0034		0,011
— w			
34—37	+ 0,0027		0,013
— w			
37—40	— 0,0025		0,012
— w			
40—43	+ 0,0025		0,013
— w			
43—46	— 0,0023		0,011
— w			
46—49	+ 0,0026		0,013
— w			

2. Blutkohle 2,0: 0,0332proz. Sulfosalicylsäure 500,0. p_H 3,5.

Länge der Kohlensäule 5,5 cm.

Zeit		Volt	Ampère
1 ^h 34—39'	Kathode + 0,0013	50	0,0039—0,0005
— w			
39—44	— 0,0003		0,0066—0,0032
— w			
44—49	+ 0,0011	100	0,004 — 0,0071
— w			
49—54	— 0,0007		0,007 — 0,0037
— w			
2 ^h 5—8	Kathode + 0,0027		0,012 — 0,015
— w			
8—11	— 0,0003		0,015—0,012
— w			
11—14	+ 0,0034		0,012 — 0,014
— w			
14—17	— 0,0005		0,014 — 0,010
— w			
17—20	+ 0,0045		0,011 — 0,014
— w			

3. Blutkohle 2,0 0,1proz. Sulfosalicylsäure 500,0. p_H 2,613
(Filtrat 50,0 ccm = n/10 NaOH 1,75 ccm).
Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
1h 21—24'	Kathode + 0,0011	50	0,008
— w			
24—27	— 0,0010		0,009
— w			
27—30	+ 0,0018	100	0,0095
— w			
30—33	— 0,0014		0,0085
— w			
36—39	Kathode + 0,0037		0,018
— w			
39—42	— 0,0011		0,0185
— w			
42—45	+ 0,0048		0,016
— w			
45—48	— 0,0011		0,012
— w			
48—51	+ 0,0035		0,012
— w			

4. Blutkohle 2,0: 1proz. Sulfosalicylsäure 500,0. p_H 1,42
(Filtrat 50,0 ccm = n/10 NaOH 35,5 ccm).
Länge der Kohlensäule 5,5 cm.

Zeit		Volt	Ampère
12h 40—43'	Kathode + 0,0008	50	0,009
— w			
43—46	— 0,0008		0,01
— w			
46—49	+ 0,0010		0,009
— w			
49—52	+ 0,0009		0,01
— w			

5. Blutkohle 2,0: 2proz. Sulfosalicylsäure 500,0. p_H 1,15
(Filtrat 20,0 ccm = n/10 NaOH 30,0 ccm).
Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
1h 19—22'	Kathode — 0,0004	30	0,0070
— w			
22—25	+ 0,0004		0,0071
— w			
25—28	— 0,0004		0,0069
— w			
28—31	+ 0,0004		0,0071
— w			

5. Blutkohle. (Fortsetzung.)

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
43—46	— 0,0010	50	0,012
— w			
46—49	+ 0,0016		0,012
— w			
49—52	— 0,0010		0,011
— w			
53—55	+ 0,0014		0,012
— w			
55—58	— 0,0010		0,012
— w			
58— 1	+ 0,0016		0,012
— w			

VIII. Versuche mit Zuckerkohle und Salzsäure.

1. Zuckerkohle 2,0: n/100 HCl 500,0. p_H 2,011 (elektrometr.).
Länge der Kohlensäule 5,0 cm."

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
11h 39—42'	+ 0,0001	50	0,0024
— w			
42—45	— 0,0019		0,0026
— w			
45—48	+ 0,0002		0,0025
— w			
48—51	— 0,0019		0,0026
— w			
	Kathode		
12h 28—31	— 0,0047	100	0,0053
— w			
31—34	+ 0,0058		0,0053
— w			
34—37	— 0,0005		0,0049
— w			
37—40	+ 0,0029		0,0048
— w			
	Kathode		
1h 2— 3	+ 0,0091	200	0,0080
— w			
3— 4	— 0,0092		0,0082
— w			
4— 5	+ 0,0210		0,0082
— w			
5— 6	— 0,018		0,0086
— w			
6— 7	+ 0,0258		0,0080
— w			
7— 8	— 0,0150		0,0082
— w			

2. Zuckerkohle 2,0: n/1000 HCl 500,0.
 p_H (elektrometr.) 3,243 (kolorimetr. 3,2). Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
2h 22—25'	— 0,0014	100	0,00275
— w			
25—28	+ 0,0014		0,0028
— w			
	Kathode		
48—51	— 0,0123	150	0,0042
— w			
51—54	+ 0,0142		0,0043
— w			
	Kathode		
54—57	— 0,0256	200	0,00555
— w			
57—60	+ 0,0327		0,0056
— w			

3. Zuckerkohle 2,0: n/10000 HCl 500,0. p_H (elektrometr.) 6,373.
 Länge der Kohlensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
10h 21—24'	— 0,0099	50	0,00135
— w			
24—27	+ 0,0096		0,0013
— w			
27—30	— 0,0098		0,00135
— w			
30—33	+ 0,0092		0,0013
— w			
	Kathode		
11h 24—25	+ 0,0133	100	0,00265
— w			
25—26	— 0,0151		0,00265
— w			
26—27	+ 0,0137		0,00265
— w			
27—28	— 0,0153		0,00265
— w			
	Kathode		
33—34	— 0,0297	150	0,004
— w			
34—35	+ 0,0327		0,004
— w			
35—36	— 0,0337		0,004
— w			
36—37	+ 0,0350		0,004
— w			

3. Zuckerkohle. (Fortsetzung.)

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
12h 10—11 — w	— 0,0540	200	0,0057
11—12 — w	+ 0,0562		0,0057
12—13 — w	— 0,0452		0,0057
13—14 — w	+ 0,0505		0,0057
14—15 — w	— 0,0505		0,0060
15—16 — w	+ 0,0512		0,0060

IX. Versuche mit Zuckerkohle und KOH.

Zuckerkohle 2,0 : n/100 KOH 500,0. Länge der Kohensäule 5,0 cm.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
10h 45—48' — w	— 0,0042	50	0,0053
48—51 — w	+ 0,0042		0,0053
51—54 — w	— 0,0044		0,0053
54—57 — w	+ 0,0043		0,00535
	Kathode		
11h 6—9 — w	— 0,0150	100	0,012
9—12 — w	+ 0,0121		0,012
12—15 — w	— 0,0150		0,012
15—18 — w	+ 0,0125		0,012
	Kathode		
58—59 — w	— 0,0112	200	0,0285
59—60 — w	+ 0,0132		0,0285
60—1 — w	— 0,0112		0,0285
12h 1—2 — w	+ 0,0129		0,0285
2—3 — w	— 0,0116		0,0285
3—4 — w	+ 0,0129		0,0285

X. Versuche mit Zucker- K_2CO_3 -Kohle und HCl.
Zucker- K_2CO_3 -Kohle 2,0 : n/1000 HCl 500,0.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
10h 20—22'	— 0,0235	220	—
— w			
22—24	+ 0,0055		—
— w			
24—26	— 0,0226		—
— w			
26—28	+ 0,0061		—
— w			

XI. Versuche mit Benzoesäure- K_2CO_3 -Kohle und Salzsäure.
Benzoesäure- K_2CO_3 -Kohle 2,0 : n/1000 HCl 500,0.

Zeit		Volt	Ampère
	Kathode		
1h 33—36'	— 0,0076	220	—
— w			
36—39	+ 0,0067		—
— w			
39—42	— 0,0075		—
— w			
42—45	+ 0,0065		—
— w			
45—48	— 0,0082		—
— w			
48—51	+ 0,0067		—
— w			

4. Die Versuche mit Sulfosalicylsäure.

A. Charakterisierung der Sulfosalicylsäure als starke zweibasische Säure.

a) Titration mit Phenolphthalein, Methylorange und Methylrot. Ich titrierte m/10 Lösung 10,0 ccm mit n/10 NaOH, und es ergab sich, daß ich bei jedem Indikator fast ganz dieselbe Menge NaOH gebrauchte, was ein Beweis für die große Stärke der Sulfosalicylsäure ist. Ich konnte auch durch die elektrometrischen Titrationsversuche feststellen, daß Sulfosalicylsäure eine ganz starke Säure ist. Das stimmt mit dem obigen Resultat überein.

	Sulfosalicylsäure etwa m/10 Lösung ccm	n/10 NaOH mit Säure äquivalenter Menge ccm
1. Phenolphthalein	10,0	17,18
2. Methylorange.	10,0	17,14
3. Methylrot	10,0	17,18

b) Elektrometrische p_H -Messungen und elektrometrische Titration. Zur elektrometrischen p_H -Messung gebrauchte ich den Gaskettenmessungsapparat nach *L. Michaelis* und bekam folgendes Resultat:

p_H von etwa m/100 Sulfosalicylsäure 2,240
 p_H „ „ m/10 „ 1,238
 p_H „ „ 3proz. „ 0,971

Aus diesem Resultat ersehen wir, daß die p_H von etwa m/100 Sulfosalicylsäure kaum anders als die einer m/50 HCl ($p_H = 2,3$) ist, daß also die Sulfosalicylsäure eine total dissoziierte zweibasische Säure ist.

Zur elektrometrischen Titration gebrauchte ich den elektrometrischen Titrationsapparat mit der Glockenelektrode nach *L. Michaelis*¹⁾ und 10,0 ccm 3proz. (= n/10 NaOH 23,32 ccm) und m/10 (= n/10 NaOH 17,18 ccm) Lösung mit n/10 NaOH schrittweise titriert. Bei der ersten Lösung sprang p_H von 3,7 plötzlich auf 9,5 und bei der zweiten von 3,3 plötzlich auf 10,5. Wenn ich nun in einem Koordinatensystem auf der Abszisse die Kubikzentimeter der zugesetzten Lauge, auf der Ordinate p_H auftrage, zeigt sich die folgende Kurve. Diese Kurve stimmt vollkommen mit der Titrationskurve einer m/5-Salzsäure überein. Der senkrechte Sprung im p_H von p_H etwa 4 bis p_H etwa 11 ist charakteristisch für die „starken Mineralsäuren“.

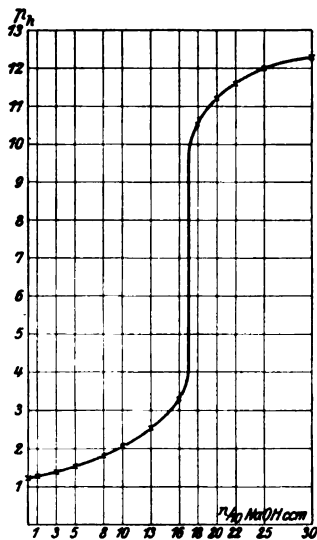


Abb. 2.

Elektrometrische Titration von Lösung der Sulfosalicylsäure.

1. 3proz. Lösung 10,0 ccm = 23,32 ccm n/10 NaOH.

Standardacetat 513,5 Millivolt gegen die gesättigte Kalomel- elektrode, Temperatur 13° ccm	NaOH n/10 L. ccm	Mill volt	p_H
10,0	0,0	306,8	0,971
	1,0	309,0	1,010
	3,0	315,3	1,120
	5,0	323,6	1,266
	10,0	351,0	1,750
	14,0	373,6	2,149
	15,0	379,1	2,246
	16,0	388,9	2,400
	18,0	404,5	2,694
	22,0	465,0	3,761
	23,0	794,5	9,572
	24,0	845,0	10,454
	25,0	861,0	10,745
	28,0	894,0	11,291
	30,0	907,0	11,556

¹⁾ *L. Michaelis*, diese Zeitschr. 79, 1 u. 2, 1917; Praktikum der physik. Chem., 2. Aufl., Berlin 1922.

2. m/10 Lösung 10,0 ccm = 17,18 ccm n/10 NaOH.

Standardacetat 514,2 Millivolt gegen die gesättigte Kalomel- elektrode, Temperatur 14° ccm	NaOH n/10 L. ccm	Millivolt	pH
10,0	0,0	322,0	1,238
	1,0	323,8	1,270
	3,0	330,0	1,379
	5,0	338,4	1,526
	8,0	354,0	1,801
	10,0	372,0	2,116
	13,0	399,0	2,591
	16,0	440,0	3,312
	18,0	851,0	10,535
	20,0	890,0	11,220
	22,0	911,0	11,590
	25,0	930,0	12,025
	30,0	943,0	12,271

B. Vergleich der Adsorption von Sulfosalicylsäure und anderen Säuren durch Blutkohle.

Um diesen Vergleich durchzuführen, titrierte ich (mit Phenolphthalein als Indikator) zuerst m/30 und m/60 Sulfosalicylsäure 50,0 ccm mit n/10 und n/20 NaOH und stellte die Konzentration der anderen Säure so ein, daß 50,0 ccm von ihr gerade dieselbe Menge NaOH neutralisierte, die ich gebraucht hatte, um 50 ccm Sulfosalicylsäure zu neutralisieren.

Adsorptionsversuche mit Säure und Blutkohle.

Säure	NaOH die 50,0 ccm Säure neutralisierende Menge ccm	NaOH äquivalente Menge mit der von Kohle adsorbierten Säuremenge ccm	Adsorption in Prozenten
I. m/30			
a) Sulfosalicylsäure .	n/10 NaOH 14,3	8,8	61,97
b) Salzsäure.	n/10 NaOH 14,3	1,4	10,00
c) Schwefelsäure. . .	n/10 NaOH 14,3	2,1	14,89
II. m/60			
a) Sulfosalicylsäure .	n/20 NaOH 14,5	11,6	82,86
b) Salzsäure.	n/20 NaOH 14,5	3,9	27,27
c) Schwefelsäure. . .	n/20 NaOH 14,5	4,3	30,07
III. a) Trichloressigsäure .	n/20 NaOH 29,0	9,95	34,79
b) Trichloressigsäure .	n/20 NaOH 14,5	5,8	41,14
IV. β -Naphthalinsulfosäure	n/20 NaOH 14,8	9,75	67,70
V. Benzolsulfosäure . . .	n/20 NaOH 14,5	6,1	42,76

Man sieht hieraus, daß verschiedene organische Säuren (Sulfosalicylsäure, Trichloressigsäure, β -Naphthalinsulfosäure, Benzolsulfosäure) stärker als HCl adsorbiert werden. Die Endosmoseversuche wurden nur mit Sulfosalicylsäure durchgeführt.

C. Die Deutung der Elektroendosmoseversuche mit Sulfosalicylsäure durch Kohlefilter.

Die Versuche über elektrische Endosmose an Diaphragmen von Kohle habe ich schon oben geschildert, und wir wollen hier aus den obigen Resultaten die Besonderheit der Versuche feststellen:

1. Die Sulfosalicylsäure wird von Kohle stärker adsorbiert, als alle bisher beschriebenen *starken* Säuren. Die Sulfosalicylsäure ist nämlich in ihrer Stärke völlig vergleichbar mit den ganz starken Mineralsäuren HCl, HNO₃ oder noch besser vergleichbar mit H₂SO₄, denn sie verhält sich wie eine zweibasische Säure, deren erste Dissoziationsstufe so stark ist, wie etwa die der Salzsäure, und deren zweite Dissoziationsstufe nur sehr wenig schwächer ist (nach Maßgabe der Bjerrumschen Theorie handelt es sich hier zweifellos nur um eine Verminderung der Ionenaktivität, nicht aber der Dissoziation), im ganzen also gerade wie bei der Schwefelsäure. Das ergibt sich daraus, daß die elektrometrische Titrationskurve einer m/10 Sulfosalicylsäure vollkommen übereinstimmt mit der Titrationskurve einer m/5 HCl, und daß andererseits das p_H einer m/100 Sulfosalicylsäure praktisch gleich ist dem einer m/50 HCl. Wir können also mit ausreichender Annäherung behaupten, daß die Sulfosalicylsäure in wässriger Lösung so gut wie total dissoziiert ist im Sinne einer zweibasischen Säure.

Nun hatten Rona und Michaelis¹⁾ für die gewöhnlichen Mineralsäuren folgende Beobachtung gemacht: sie werden sämtlich von Kohle adsorbiert, und zwar in wechselnden Beträgen. Die Adsorption jeder Mineralsäure wird, umgekehrt wie man es auf Grund des Verdrängungsgesetzes erwartete, durch Zusatz eines gleichionigen Neutralsalzes *erhöht*. So wird z. B. die Adsorption einer m/100 HCl-Lösung durch den Zusatz von KCl erhöht. Durch Steigerung der KCl-Menge kommt man bald an einen Grenzwert für die Adsorption der HCl, welcher durch weitere Steigerungen des KCl-Zusatzes nicht überschritten wird. Dieser Grenzwert erwies sich als gleich für alle untersuchten Mineralsäuren, HCl, HNO₃, H₂SO₄. Die Deutung dieses Befundes war folgende: Bei allen Mineralsäuren ist das H-Ion viel stärker adsorbierbar als das Anion. Die Einstellung des wahren Adsorptionsgleichgewichtes der H-Ionen wird aus elektrostatischen Ursachen durch die Anionen der Säure verhindert; wenn die H-Ionen in der adsorbierenden Grenzfläche sich anreichern, müssen sie aus elektrostatischen Ursachen die Anionen mitschleppen. Daher werden mehr Anionen adsorbiert als ihrem wahren Adsorptionsgleichgewicht entsprechen würde. Hierzu ist eine gewisse Arbeitsleistung nötig, welche aber nicht von der absoluten Menge der mitgeführten Anionen abhängt, sondern nur von dem Logarithmus des *Verhältnisses* der Konzentrationen vor und nach der Adsorption. Ist nun die Konzentration der Anionen sehr groß, so ist dieses Verhältnis nur wenig von 1 verschieden, daher die aufgewendete Arbeit fast 0. Die Mitführung der Anionen geschieht dann fast kräftefrei.

Jener oben beschriebene, für alle Mineralsäuren gleiche Grenzwert der Adsorption bei Überschuß von Neutralsalz stellt demnach nichts weiter vor, als die reine, durch Gegenkräfte nicht getrübe Adsorbierbarkeit des H-Ions. Keine Säure, deren Anion weniger adsorbierbar ist als das H-Ion, kann daher bei noch so großem Überschuß an Neutralsalz stärker adsorbiert werden, als z. B. HCl.

¹⁾ Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 97, 85, 1919.

Die Versuche ergaben nun, daß Sulfosalicylsäure viel stärker adsorbiert wird als HCl. Wenn unsere Theorie richtig war, so konnte diese Erscheinung nur darauf beruhen, daß das Anion dieser Säure an sich stärker adsorbiert wird als das H-Ion. Daraus würde weiter folgen, daß in einer Lösung von Sulfosalicylsäure die elektrische Ionendoppelschicht stets so gebaut sein muß, daß die Anionenschicht der Kohle anhaftet und die Kationenschicht in die Flüssigkeit hineinragt. Es müßte daher die elektrische Ladung der Kohle in Sulfosalicylsäure bei noch so großem Überschuß dieser Säure negativ bleiben, während sie durch HCl und dergleichen positiv geladen werden muß. Dies wurde durch die obigen elektroendosmotischen Versuche geprüft und vollkommen bestätigt. Schon Perrin¹⁾ hatte beschrieben, daß Kohle in Laugen negativ, in Säuren positiv geladen ist. Gyemant²⁾ hat dies im Laboratorium von L. Michaelis bestätigt und z. B. gefunden, daß Kohle in HCl-Lösungen positiv geladen ist, sobald p_H kleiner wird als etwa 3 bis 4. Diese Versuche wurden jetzt mit verbesserter Methode wiederholt und als isoelektrischer Punkt der Blutkohle bei Gegenwart von HCl $p_H = 3,0$ gefunden. In Lösungen, welche saurer sind als diese, ist die Kohle positiv geladen. Gegenwart von KCl (m/10 neben der HCl) änderte nichts an diesem Verhalten.

Im Schwefelsäure ergab sich prinzipiell das gleiche, nur waren alle Ausschläge bei der Endosmose geringer, so daß der isoelektrische Punkt nicht mit der gleichen Schärfe bestimmt werden konnte. Im Gegensatz hierzu zeigte Kohle in Lösungen von Sulfosalicylsäure beliebiger Konzentrationen stets negative Ladung, und zwar erwies sich das zuerst von Perrin formulierte Gesetz auch hier als gültig, daß bei steigender Säuerung die Negativität zurückgeht. Aber durch keinen noch so großen Überschuß von Sulfosalicylsäure gelang es, die negative Ladung ganz zu vernichten, geschweige denn in eine positive umzukehren.

Durch diese Erscheinungen wird die Theorie der Ionen-Doppelschichten an der Kohle wiederum bestärkt.

5. Über ampholytoide und acidolde Kohlenarten.

In der Literatur besteht ein Widerspruch bezüglich der Umladbarkeit der Kohle. Perrin³⁾ fand mit einer ganzen Reihe von Pulvern (Kohle, Schwefel, Carborund, Naphthalin, Salol, CrCl₃, AgCl, BaSO₄, ZnO, CuO, Gelatine u. a.), daß in saurer Lösung das Wasser stets nach der Anode, in schwach alkalischer nach der Kathode wandert, d. h. das Pulver gegen saure Lösung positiv, gegen alkalische negativ geladen war. Er hat sogar bemerkt, daß der Umkehrpunkt der elektrischen Ladung nicht immer genau bei neutraler Reaktion liegt. Bethe und Toropoff⁴⁾ beobachteten, daß Kohle durch Säuren in ihrer Negativität zwar geschwächt, aber niemals umgeladen

¹⁾ J. Perrin, Mécanisme de l'Electrisation de content et solutions colloïdales. Journ. Chim. phys. 2, 601 u. 3, 50, 1904 u. 1905.

²⁾ A. Gyemant, Kolloid-Zeitschr. 28, 3, 1921.

³⁾ J. Perrin, Mécanisme de l'Electr. de content et solutions coll. Journ. Chim. phys. 2, 601, u. 3, 50, 1904 u. 1905.

⁴⁾ Bethe und Toropoff, Zeitschr. f. phys. Chem. 88, 686, 1914; 89, 597, 1915.

wird. *Gyemant*¹⁾ wiederum bestätigt die Umladbarkeit durch Säuren, und zwar fand er den Indifferenzpunkt der elektrischen Ladung bei einem p_H zwischen 3 bis 4. *Bethe* und *Toropoff* arbeiteten mit zerstoßener Retortenkohle, *Gyemant* mit Blutkohle. Es lag daher die Vermutung nahe, daß der Widerspruch auf einer Verschiedenartigkeit der Kohlenpräparate beruhte. Diese Vermutung hat sich bestätigt. Die im ersten Abschnitt beschriebenen Versuche wurden nämlich mit Blutkohle (*Merck*) ausgeführt. Diese Kohle erwies sich, wie gesagt, als umladbar, der Indifferenzpunkt lag bei $p_H = 3,0$, und zwar unabhängig davon, ob wir die HCl rein oder mit einem Überschuß von KCl (n/10) angewendet hatten. Bei Verwendung von H_2SO_4 ist die Endosmose viel träger, der Indifferenzpunkt unschärfer zu bestimmen, er schien aber nicht deutlich verschieden von dem für HCl zu sein.

Eine andere Reihe von Versuchen wurde nun mit einer durch Verkohlen von Zucker hergestellten Kohle ausgeführt, und mit dieser erhielten wir dasselbe Resultat wie *Bethe* und *Toropoff*, d.h. sie war immer negativ geladen. Die Ladung, gemessen an der Stärke der Endosmose, konnte durch Säurezusatz zwar stark vermindert, aber niemals vernichtet oder umgekehrt werden.

Nach *L. Michaelis* können wir einen nicht molekulardispersen Stoff, welcher OH-Ionen adsorbiert oder H-Ionen abdissoziiert unter Erhaltung der negativen Ladung (oder H-Ionen adsorbiert unter Neutralisierung seiner vorher negativen Ladung), ein Acidoid nennen. Analog können wir das Basoid und einen Stoff wie Kohle als *Ampholytoid* definieren. Es ist dies eine Übertragung der Definitionen für Säure, Base und Ampholyt auf nicht molekulardisperse Stoffe. Säure ist eine Molekülart, welche OH-Ionen unter Erhaltung der negativen Ladung bindet, Base ist eine solche, welche H-Ionen bindet, und Ampholyt ist eine solche, welche beide Ionenarten je nach den Umständen bindet. So würden wir also Zuckerkohle oder Retortenkohle als ein Acidoid bezeichnen, d. h. einen in Wasser unlöslichen Körper, welcher aber, abgesehen von seiner Unlöslichkeit, alle Charaktere einer Säure zeigt; und die Blutkohle würden wir als ein Ampholytoid bezeichnen, d. h. als einen Stoff, der, abgesehen von seiner Unlöslichkeit, die Eigenschaft eines Ampholyten zeigt, bei irgend einem bestimmten p_H von endlicher Größe einen isoelektrischen Punkt zu besitzen. Wir sind ja durch manche Untersuchungen zu der Anschauung gekommen, daß die sogenannte amorphe Kohle nicht unbedingt als elementarer Kohlenstoff zu betrachten ist. So haben z. B. *K. A. Hofmann* und *W. Freyer*²⁾ nachgewiesen, daß Ruß geradezu Stoffe von ausgesprochenem Säurecharakter enthält. Es ist also sehr wohl möglich, daß die Natur des Ausgangsmaterials, welches man für die Darstellung der Kohle wählt, einen Einfluß auf die chemische Konstitution der aus ihr hervorgehenden sogenannten „Kohle“ hat. Es ist allerdings auch denkbar, daß Verschiedenheiten der Struktur des Kohlenstoffraumgitters die Unterschiede verursachen. Die beim Verbrennen von Zucker entstehenden Säuren prägen vielleicht der aus ihnen durch weitere Erhitzung entstehenden Kohle den Acidoidcharakter auf; und die aus dem eiweißhaltigen Blut entstandene Kohle spiegelt den amphotereren Charakter der Eiweißkörper wieder, obwohl kein Stickstoff in ihr mehr nachweisbar ist.

¹⁾ *A. Gyemant*, Kolloid-Zeitschr. 28, 3, 1921.

²⁾ *K. A. Hofmann* und *W. Freyer*, Berichte der deutsch. chem. Ges., Jahrg. 53, S. 2076, 1920.

6. Über die Adsorptionsaffinitäten der verschiedenen Kohlearten.

Das Adsorptionsvermögen der Blutkohle haben *Lachs* und *Michaelis*¹⁾, sowie *Rona* und *Michaelis*²⁾ systematisch untersucht. Man kann folgende wesentliche Gesichtspunkte, soweit sie für die folgenden Fragen in Betracht kommen, als Ergebnis dieser Arbeiten zusammenstellen.

1. Gegenüber elektroindifferenten, oberflächenaktiven, wasserlöslichen Stoffen, wie Aceton, Octylalkohol und dergleichen, hat Blutkohle ein Adsorptionsvermögen, welches dasjenige aller anderen pulverförmigen Substanzen bei weitem übertrifft.

2. In geringerem Grade, aber doch noch sehr merklich, adsorbiert Blutkohle auch sämtliche Elektrolyte (mit Ausnahme der Alkalisulfate). Die Adsorption eines Elektrolyten setzt sich additiv aus der Adsorbierbarkeit des Anions und des Kations zusammen. Als besonders gut adsorbierbare Ionen haben sich herausgestellt die H- und OH-Ionen, die mehrwertigen Metall-Ionen, besonders aber alle organischen Farbstoff-Ionen und Alkaloide. Blutkohle adsorbiert in ausgezeichneter Weise sowohl geeignete Kationen (H, Methylenblau, Chinin) wie Anionen (OH, Eosin, Pikrinsäure). Nach Maßgabe ihrer Adsorbierbarkeit kann man eine genau geordnete Reihe der Anionen und eine Reihe der Kationen aufstellen. Es ist zu erkennen, daß in dieser Reihe das Prinzip der Entladungsspannung eine Rolle spielt. Edlere Metalle sind als Ionen besser adsorbierbar als geringere, außerdem scheint die Wertigkeit in dem Sinne einen Einfluß zu haben, daß mehrwertige Ionen besser adsorbiert werden.

3. Zwei oberflächenaktive, elektroindifferente Stoffe verdrängen einander bei der Adsorption (z. B. Aceton: Essigsäure, Zucker: Aceton); zwei gleichsinnige Ionen verdrängen einander ebenfalls, z. B. ein basischer Farbstoff: ein zweiter basischer Farbstoff, dagegen ist zwischen einem oberflächenaktiven Nichtelektrolyten und einem gut adsorbierbaren Ion eine Konkurrenz um einen Platz an der Oberfläche nicht oder nur in sehr geringem Maße nachweisbar [z. B. NaCl : Aceton³⁾]. Es gibt also zwei verschiedene Typen von Adsorbenden; gegenseitige Verdrängung, gegenseitige Konkurrenz um einen Platz an der Oberfläche zeigen je zwei Stoffe nur, wenn sie dem gleichen Typus angehören.

4. Demnach hat es fast den Anschein, als ob die Blutkohle ein Gemisch zweier verschiedenartiger Adsorbentien sei, eines für die Gruppe der oberflächenaktiven Nichtelektrolyte und eines für Ionen. Wenigstens könnte man eine solche Vorstellung vorläufig versuchsweise zugrunde legen. In ihrer Eigenschaft als Adsorbens für oberflächenaktive Nichtelektrolyte steht die Kohle ganz einzig da. Nur ganz wenige andere Pulver haben Andeutungen dieser Eigenschaft (Talk, Schwefel), die meisten in dem Ruf guter Adsorbentien stehenden Pulver (Kaolin, Eisenoxyd, Tonerde usw.) adsorbieren oberflächenaktive Nichtelektrolyten auch nicht in den allergeringsten Spuren.

Auf Grund dieser Erkenntnis war es geboten, die adsorptiven Eigenschaften der verschiedenen Kohlenarten miteinander zu vergleichen, denn die bisherigen Angaben beziehen sich alle auf Blutkohle.

¹⁾ *Lachs* und *Michaelis*, Kolloid-Zeitschr. 9, 275, 1911; Zeitschr. f. Elektrochem. 17, 1 und 917, 1911.

²⁾ *Michaelis* und *Rona*, diese Zeitschr. 15, 196, 1908; 16, 489, 1909. *Rona* u. *Michaelis*, ebendasselbst 94, 240; 97, 85; 103, 19, 1920; 94, 225; 97, 57; 102, 268, 1920; Kolloid-Zeitschr. 25, 225, 1919.

³⁾ *H. Lachs* und *L. Michaelis*, Kolloid-Zeitschr. 9, 275, 1911.

Schon einige orientierende Versuche zeigten, daß allgemein gültige Angaben über das Adsorptionsvermögen zweier verschiedener Kohlearten nicht möglich sind, weil spezifische Eigenschaften der verschiedenen chemischen Substanzen hervortreten. Ganz entgegen der früher üblich gewesenen Annahme zeigte sich, daß, wenn man die zu adsorbierenden Stoffe in eine Reihe nach dem Grade der Adsorbierbarkeit ordnet, diese Reihe durchaus verschieden ist, wenn man verschiedene Kohlensorten anwendet. Es konnte daher nicht die Aufgabe dieser Arbeit sein, diese Frage erschöpfend zu behandeln. Wir begnügen uns mit einigen Beispielen.

Vergleich der Adsorptionskraft von verschiedenen Kohlensorten.

		Blutkohle (1,0 g : 100,0 ccm)	Benzoesäure K_2CO_3 -Kohle (2,5 g : 100,0 ccm)	Zuckerkohle (2,5 g : 100,0 ccm)
		Tropfenzahl des Filtrats		
1.	Octylalkohol: Tropfenzahl d. Ausgangslösung 157. (Für Aqua dest. 98) . . .	106	106	106
2.	Tributyrin: Tropfenzahl d. Ausgangslösung 154. (Für Aqua dest. 105) . .	115	145	145
		Adsorbierte Menge		
3.	Essigsäure: 10,0 ccm = n/20 NaOH 20,5 ccm	13,42	26,59	17,75
4.	Benzoesäure: gesättigte Lösung	30,81	47,87	45,02
5.	Aceton: 0,2 proz. Lösung	16,27	53,61	60,92
6.	Jod: n/10 J-K J-Lösung	74,14	73,45	—

Wir sehen aus dieser Tabelle, daß solche Mengen von Kohle verschiedener Sorte, welche in bezug auf Octylalkohol gleichwertig für die Adsorption sind, auch gegen einige andere adsorbierbare Stoffe gleichwertig oder wenigstens einigermaßen gleichwertig sind. Und zwar sind dies Essigsäure und Jod. Dagegen gibt es wieder andere Stoffe, bei denen dies nicht zutrifft. So wird Aceton von der Benzoesäure und Zuckerkohle relativ viel stärker als von Blutkohle adsorbiert, dagegen Tributyrin ganz auffällig viel schwächer. Diese kaum zu erwartenden Befunde wurden durch mehrfache Wiederholung völlig gesichert.

Ein Versuch mit einer zweiten Probe Zuckerkohle ergab: das äquivalente Verhältnis dieser Zuckerkohle zu Blutkohle, gemessen an Octylalkohol, ist 24 g : 1 g, wie zunächst genau ausgeeicht wurde. Nunmehr wird je 1 g Blutkohle oder je 24 g Zuckerkohle pro 100 ccm Lösung verwendet, und es findet sich:

Asorbendum	Blutkohle	Zuckerkohle
	adsorbiert	
	%	%
0,01 n HCl	6,6	0
0,01 n Sulfosalicylsäure	26,5	0
0,1% Pikrinsäure	49,2	0

Die Zuckerkohle adsorbiert somit Säuren überhaupt nicht, nicht einmal Pikrinsäure.

Untersuchen wir das Verhalten der verschiedenen Kohlenarten gegen organische Farbstoffe, so zeigt sich folgendes. Die Versuche wurden wiederum mit solchen Mengen der verschiedenen Kohlearten ausgeführt, welche gegenüber Oktylalkohol „gleichwertig“ waren.

	Blutkohle (0,1 g : 100,0 ccm)	Benzoesäure K_2CO_3 -Kohle (2,5 g : 100,0 ccm)	Zuckerkohle (2,5 g : 100,0 ccm)
	Adsorbierte Menge		
1. Methylenblau (1 prom.-Lösung)	75	33	30
2. „ (0,1 prom.-Lösung)	99	98	78
3. Fuchsin (0,1 prom.-Lösung)	99	97	90
4. Diaminocchrot - Ammonium- salz (0,1 prom.-Lösung)	99	90	83
5. Eosinkalium (0,1 prom.-Lösung)	97	0	0
6. Pikrinsäure (1 prom.-Lösung)	60	0	0

Wir sehen aus dieser letzten Tabelle, daß *Blutkohle* alle untersuchten Farbstoffe gut adsorbiert. *Benzoesäure* und *Zuckerkohle* adsorbiert Farbstoffe erstens überhaupt weniger, zweitens bestehen deutliche Unterschiede bei den sauren und basischen Farbstoffen. Die basischen Farbstoffe werden deutlich adsorbiert, die sauren, Eosin und Pikrinsäure, werden überhaupt nicht adsorbiert. Diaminocchrot gehört zu den sogenannten substantiven Baumwollfarbstoffen; es hat einen zwar überwiegend sauren Charakter, enthält aber auch NH_2 -Gruppen. Diese Baumwollfarbstoffe verhalten sich auch sonst in der Färberei nicht wie die gewöhnlichen sauren Farbstoffe. Ohne auf die Theorie dieser besonderen Farbstoffe einzugehen, ist es doch interessant, daß sie gegenüber der Zuckerkohle sich in demselben Sinne abweichend von den gewöhnlichen sauren Farbstoffen verhalten, wie gegenüber der Baumwolle, wahrscheinlich steht das im Zusammenhang mit dem kolloidalen Charakter dieser Farbstoffe, während Eosin und Pikrinsäure keine kolloidalen Eigenschaften zeigen.

Es zeigt sich also folgendes:

1. Bezüglich der Adsorption oberflächenaktiver Nichtelektrolyte verhalten sich die verschiedenen Kohlenarten oft recht gleichmäßig. Wenn man nun ausprobiert, welche Mengen irgend eines bestimmten Präparates von Blutkohle, Zuckerkohle, Benzoesäurekohle erforderlich sind, um aus einer gegebenen Lösung von Oktylalkohol die gleiche Menge zu adsorbieren, so erhält man zahlenmäßige Vorstellungen über die Äquivalenz der verschiedenen Kohlenarten gegen Oktylalkohol. So brauchten wir z. B. bei dem einen Präparat 2,5 mal soviel Benzoesäurekohle als Blutkohle, um einen gleichen Effekt gegen Oktylalkohollösung zu erreichen. Hat man aber diese Zahl für Oktylalkohol festgestellt, so zeigt sich, daß diese, wenn auch nicht immer streng gleich, aber doch auffällig ähnlich, sich wiederfindet für andere oberflächenaktive und indifferente Stoffe, also gegen Aceton, Essigsäure (deren Dissoziation gering genug ist, um sie bei der Frage der Adsorption den oberflächenaktiven Nichtelektrolyten einreihen zu können), ja sogar bei Jod; es gibt allerdings auch Ausnahmen hiervon (Tributylin).

2. Bezüglich der *Ionenadsorption* aber verhalten sich die beiden Kohle-typen ganz verschieden, Blutkohle adsorbiert, wie gesagt, geeignete Kationen und Anionen fast gleich gut. Zucker- und Benzoesäurekohle adsorbiert Ionen zunächst einmal überhaupt wesentlich schlechter. Aber Kationen (Methylenblau) werden immerhin in gut meßbarer Weise adsorbiert, während Anionen (Eosin, Pikrinsäure) nicht einmal in Spuren von dieser Kohle adsorbiert werden. Dies stimmt ausgezeichnet mit den Erwartungen überein, die man aus den oben mitgeteilten Befunden über die Endosmose haben könnte. *Blutkohle als Acidoid bindet nur Kationen, Blutkohle verhält sich, abgesehen von seiner Unlöslichkeit, wie ein Ampholyt, und Zuckerkohle wie eine Säure.*

Zusammenfassung.

1. Blutkohle hat im allgemeinen in saurer Lösung eine positive, in alkalischer Lösung eine negative Ladung. Der isoelektrische Punkt wurde von mir aufs neue bestimmt und bei $p_H = 3,0$ gefunden.

2. Die Deutung dieser Ladung läßt sich in der Weise geben, daß die H-Ionen im allgemeinen stärker adsorbiert werden als die Anionen der Säure, und andererseits, daß die OH-Ionen stärker adsorbiert werden als die Kationen der Base.

3. Es ergibt sich nun, daß sich die Sulfosalicylsäure durch ihre ganz besonders starke Adsorbierbarkeit vor den anderen starken Säuren auszeichnet. Im Sinne der üblichen Theorie konnte das nur dadurch gedeutet werden, daß die Anionen *dieser* Säure *noch* stärker adsorbiert werden als die H-Ionen. In diesem Falle mußte Blutkohle in noch so starken Lösungen von Sulfosalicylsäure negativ geladen bleiben.

4. Diese Voraussagen wurden durch Endosmoseversuche bestätigt und damit die Theorie der Aufladung der Kohle befestigt.

5. Im Gegensatz zur Blutkohle läßt sich eine aus Zucker oder aus Benzoesäure hergestellte Kohle durch keine Säure positiv umladen. Blutkohle verhält sich daher wie ein „Ampholytoid“, Zuckerkohle wie ein „Acidoid“ im Sinne der Definition von *Michaelis*.

Ganz dementsprechend adsorbiert Blutkohle saure und basische Farbstoffe fast gleich gut, während Zuckerkohle, welche Farbstoffe überhaupt schlechter adsorbiert, nur basische, aber keine sauren Farbstoffe adsorbiert.

6. Dagegen ist das Adsorptionsvermögen dieser beiden Kohlearten gegen oberflächenaktive elektroindifferente Stoffe einigermaßen, wenn auch nicht genau, gleichartig; der Unterschied der beiden Kohlearten prägt sich im wesentlichen nur gegenüber der Ionenadsorption aus.

Über den Einfluß des Säuren- und Basengehalts der Nahrung auf die Zusammensetzung des Harns wachsender Hunde.

Von
Jonas Borak.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitätsinstituts.)

(Eingegangen am 10. November 1922.)

I. Einleitung.

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Untersuchungen von *Ragnar Berg*, welcher bei der Erforschung des Zusammenhangs zwischen dem organischen und anorganischen Stoffwechsel zu einer Reihe von Ergebnissen gelangte, die zu einigen völlig neuen Gesichtspunkten in der Beurteilung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Nahrung führten¹⁾.

Wir wissen, daß eine zweckmäßige Nahrung durch Kalorienmenge, Eiweiß-, Fett-, Kohlehydrat- und Vitamingehalt noch immer nicht erschöpfend charakterisiert erscheint, daß sie vielmehr auch eine genügende Menge verschiedener Salze, denen die Bedeutung von Regulatoren osmotischer Differenzen sowie eine Reihe spezifischer Funktionen zukommt, enthalten muß.

Berg meint nun, daß den mineralischen Salzen noch in einer besonderen Richtung eine sehr erhebliche Bedeutung zufällt, die sich daraus ergibt, daß sie zum großen Teile die *Reaktion der Gewebe* bestimmen, welche auf den Ablauf der Stoffwechselvorgänge von großem Einflusse ist.

Die Änderung der Reaktion eines chemischen Milieus beeinflusst in hohem Grade sowohl die Richtung der Oxydationsprozesse als auch die Menge der Zwischen- und Endprodukte, so daß ein Organismus hierdurch auf mannigfache Art betroffen werden kann. So werden

¹⁾ Von *Bergs* Arbeiten seien genannt: *C. Röse* und *R. Berg*, Über die Abhängigkeit des Eiweißbedarfs vom Mineralstoffwechsel. Münch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 37. — *K. Birkner* und *R. Berg*, Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel. Zeitschr. f. klin. Med. 1903, Nr. 77. — *R. Berg*, Untersuchungen über den Mineralstoffwechsel. Ebendasselbst Nr. 88. — *R. Berg*, Die Bewertung der Säureverhältnisse im Harn. Münch. med. Wochenschr. 1917, Nr. 25. — *R. Berg*, Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der Arthritis. Ebendasselbst 1914, Nr. 23. — Über *Bergs* Arbeiten orientiert: *Grumme*, Der Zusammenhang des organischen und anorganischen Stoffwechsels. Berlin. klin. Wochenschr. 1919, S. 21.

Eiweißkörper bei der normalen Reaktion der Gewebe durch eine komplizierte Reihe von Zwischenstoffen hindurch zuletzt zu Ammoniak und Kohlensäure abgebaut, welche dann, zu Harnstoff umgeformt, den Organismus verlassen. Erhält aber das Milieu, in dem sich diese Vorgänge abspielen, eine Reaktion von saurem Charakter, so kommt es erstens nicht zum vollständigen Abbau der Eiweißkörper, sondern es häufen sich normalerweise noch weiter spaltbare Zwischenprodukte an. Zweitens wird bei der so geänderten Gewebsreaktion die Kohlensäure aus ihren Ammoniumverbindungen durch andere Säuren verdrängt, so daß eine vermehrte Ausscheidung von Ammoniak und eine Verminderung der Harnstoffausfuhr im Harn resultiert.

Diese Erscheinungen sind als Symptome einer *Säurevergiftung* längst schon bekannt. *Berg* sucht nun nachzuweisen, daß sie nicht nur durch künstliche Einführung großer Mengen freier anorganischer Säuren, sondern auch durch *die in der physiologischen Breite unserer täglichen Ernährung liegenden Schwankungen des anorganischen Salzgehalts* unserer Nahrung hervorgerufen werden können und tatsächlich die unvermeidliche Folge unserer üblichen Ernährungsweise darstellen. Der Harn eines zweckmäßig ernährten Menschen dürfte nach *Berg* vielleicht überhaupt nicht [sehr wesentliche Mengen anderer Stickstoffverbindungen enthalten als Harnstoff¹⁾] oder was damit Hand in Hand geht, er müßte als Ausdruck normaler Gewebsreaktion stets „alkalisch“ reagieren.

Berg gibt ferner zu bedenken, daß die mineralischen Salze in unserer Nahrung mit Ausnahme des Kochsalzes fast nie in ionisierbarer Form vorkommen, sondern stets in hochmolekularen, nicht ionisierbaren organischen Verbindungen enthalten sind und daß durch sie auch das Schicksal der mit ihnen verbundenen organischen Nahrungsbestandteile mitbestimmt wird. *Berg* geht hierbei auf die von *Salkowski*²⁾ hervorgehobene Tatsache zurück, daß anorganische Säuren den Körper stets in Form von gesättigten, anorganischen Salzen verlassen und daß, wenn dem Organismus zu ihrer Sättigung nicht genügend anorganische Basen zur Verfügung stehen, er die nötigen Alkalimengen aus dem eigenen Bestande abbauen muß, um die Säuren zu neutralisieren. Hiermit aber, meint *Berg*, ist ein Abbau des eigenen Eiweißes verbunden. Abgesehen davon, daß dies zu verschiedenen Stoffwechselstörungen Veranlassung geben kann, ist aus diesem Grunde mit einer vorwiegend sauren Nahrung auch ein erhöhter Eiweißbedarf verbunden. Daraus zieht *Berg* den Schluß, daß in einer zweckmäßigen Nahrung

¹⁾ So heißt es an einer Stelle: „Es ist überhaupt die Frage, ob der Mensch bei vom ersten Anfang an dauernder gesunder Nahrung und im übrigen gesunder Lebensweise jemals Harnsäure produzieren würde“. Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 1278.

²⁾ *Salkowski*, Virchows Arch. 1873, S. 23; 1871, S. 214.

anorganische Salze von *alkalischem* Charakter überwiegen sollen, was eine *Herabsetzung des Eiweißbedarfs* zur Folge hat.

Berg ist zu diesen Ergebnissen auf Grund jahrelanger Versuche gelangt, die er zum Teil mit *Röse* und *Birkner* ausgeführt, aber bis jetzt nur auszugsweise veröffentlicht hat. Theoretische und experimentelle Ansätze für die von *Berg* vertretenen Ansichten lassen sich schon in der älteren physiologischen Literatur finden. So hat *Forster*¹⁾ zuerst Versuche angestellt, aus welchen hervorging, daß mit salzarmer Nahrung gefütterte Tiere kürzer lebten als Kontrolltiere, die *ceteris paribus* salzreicher ernährt wurden. *Bunge*²⁾ hat auf Grund rein theoretischer Überlegungen *Forsters* Versuche so gedeutet, daß es sich hierbei um Neutralisierung des in den zugeführten Eiweißkörpern stets vorhandenen Schwefels, welcher im Organismus zur Schwefelsäure oxydiert wird, durch körpereigene Basen handle. Diese Deutung hat *Lunin*³⁾ experimentell bestätigen können, indem er zeigte, daß sich die Lebensdauer der salzarm ernährten Tiere durch Zufuhr von Soda verlängern ließ.

Im Anschluß an *Berg* sind dann einige Arbeiten entstanden, in welchen zu den von ihm aufgerollten Problemen Stellung genommen wird. Wir erwähnen die Arbeiten von *Jansen*⁴⁾ und von *Fuhge*⁵⁾, welche auf Grund von Versuchen an Erwachsenen und an Kindern *Bergs* Ergebnisse zum Teil bestätigen konnten, zum Teil ablehnen mußten⁶⁾.

Wir haben die von *Berg* angeregten, sowohl theoretisch interessanten, als auch praktisch bedeutsamen Probleme auf die Weise in Angriff genommen, daß wir zum Unterschiede von den genannten Autoren nicht an Menschen, sondern an *Hunden* entsprechende Stoffwechselversuche angestellt und uns hierbei, um das eigentliche Problem in voller Reinheit hervortreten zu lassen, keiner Zulagen zur Nahrung in Form von basischen oder sauren Salzen bedient haben, sondern ausschließlich den Einfluß studierten, den eine Kost ausübt, je nachdem in ihr saure oder basische Salze überwiegen.

II. Methodisches.

Unsere diesbezüglichen Versuche zerfallen in zwei Abschnitte. Im ersten Versuchsabschnitt stand uns ein Hund zur Verfügung, den wir zuerst auf eine Kost mit einem Überschuß an basischen Mineralsalzen („*basische Versuchsperiode*“) und sodann auf eine solche mit Säureüberschuß („*saure Versuchsperiode*“) setzten. Im zweiten Abschnitt experimentierten wir mit zwei Hunden von gleichem Wurf, somit gleichen Alters, von denen der eine auf basische, der andere auf saure Kost gesetzt wurde.

Die Hunde waren 5 bzw. 7 Wochen alt, ein Umstand, der den *Bergschen* Voraussetzungen für eine rasche Durchführung der Versuche am besten

¹⁾ *Forster*, Zeitschr. f. Biol. 9, 334.

²⁾ *Bunge*, ebendasselbst 10, 130.

³⁾ *Lunin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1881.

⁴⁾ *Jansen*, Zeitschr. f. klin. Med. 88, 1919.

⁵⁾ *Fuhge*, Arch. f. Kinderheilk. 1922.

⁶⁾ Siehe auch v. Noorden, Allgemeine Ernährungslehre 1, 75.

entsprach. Nach *Berg*¹⁾ sind nämlich sowohl die Dauer der Versuche, als auch die Anfangsergebnisse sehr stark von der gewohnten Ernährungsweise des Versuchsobjekts abhängig. Werden die Versuche mit Menschen unternommen, so muß, da die menschliche Nahrung in der Regel einen Überschuß von sauren Salzen enthält, zuerst eine sehr lange, einige Wochen währende Vorversuchsperiode vorausgeschickt werden, bevor die eigentliche „basische Periode“ eingeleitet werden kann. Bei jungen, nur mit Milch (die einen geringen Überschuß an Alkalisalzen aufweist) vorernährten Hunden, deren Organismus, um sich eines Ausdrucks von *Berg* zu bedienen, noch nicht „übersäuert“ ist, entfiel nun die Notwendigkeit einer längeren Vorversuchsperiode, was die Versuche übersichtlicher und weniger zeitraubend gestaltete.

Unsere Versuchsperioden, während welcher sich die Hunde auf eine bestimmte Kostart einstellen, dauerten in der Regel acht Tage.

Als Grundlage für die Berechnung des Mineralgehalts der in Anwendung gebrachten Nahrungsmittel dienten uns die von *Berg* veröffentlichten Aschenanalysen²⁾. *Berg* führt den mineralischen Gehalt der Nahrungsmittel nicht nur in Form einzelner Nahrungsbestandteile in Milligrammen an, also basische Elemente, wie Na, K, Ca, NH₃ usw. bzw. saure wie S, P, Cl, sondern stets auch den Überschuß, den jedes Nahrungsmittel an Bestandteilen der einen Gruppe über die äquivalente Menge der anderen Gruppe enthält. Es wird also von einem Nahrungsmittel, z. B. 100 g Roggenmehl, angegeben, daß es einen Säureäquivalentüberschuß von 16,5 mg enthält. Es ist somit das Roggenmehl als saures Nahrungsmittel anzusehen. Der Unterschied zwischen saurer und basischer Ernährung fällt nicht mit dem von animalischer und vegetabilischer zusammen; denn, wenn die animalischen Produkte auch in der Regel einen Säureüberschuß aufweisen, so sind doch sehr viele vegetabilische Produkte, wie eben alle Mehlsorten, vorwiegend sauren Charakters. Für eine zweckmäßige Nahrung eines erwachsenen Menschen fordert *Berg* einen Überschuß von etwa 25 mg an basischen Bestandteilen über die äquivalente Menge saurer Bestandteile in der Tagesnahrung. Wir führten unseren Versuchstieren in der basischen Ernährungsperiode einen Überschuß von etwa 18 bis 20 mg-Äquivalenten basischer Salze in der Tagesnahrung und in der sauren Periode einen ungefähr gleich großen Überschuß an sauren Salzen täglich zu. Einer Anregung von *Berg* folgend, verabfolgten wir den Hunden das Gemüse stets zusammen mit dem Wasser, in dem es gekocht wurde, um so Verluste an anorganischen Salzen zu vermeiden.

Von basischen Nahrungsmitteln verabreichten wir: Milch, Kartoffeln und Karotten bzw. Sojabohnen³⁾, von sauren: Kuttelfleck, Roggenbrot, Roggenmehl.

¹⁾ Münch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 37.

²⁾ *Berg*, Die Nahrungs- und Genußmittel. 1913.

³⁾ Vgl. *Ludwig Berczeller*, Wien. klin. Wochenschr. 43, 921.

Der *Stickstoffgehalt der Nahrung*, den wir an wiederholten Stichproben nach *Kjeldahl* bestimmt haben, betrug etwas mehr als 0,7 g pro Kilogramm des Körpergewichts, und entsprach somit etwa 4,3 g Eiweiß täglich, welche Menge auch für einen wachsenden Organismus als genügend angesehen werden muß. Bei jedem Nahrungsmittel bestimmten wir auch den *Wassergehalt*, um den Tieren eine stets gleiche Menge Flüssigkeit zuzuführen. Da uns in erster Linie der Eiweißstoffwechsel beschäftigte, bestimmten wir nicht selbst den *Kohlenhydratgehalt* der Nahrungsmittel, schätzten ihn aber stets nach den bekannten Tabellen von *Schall* und *Heisler*¹⁾.

Die Tiere befanden sich während der ganzen Versuchsdauer in den bekannten Versuchskäfigen, welche ein quantitatives Auffangen des Harns erlaubten. Zur Hintanhaltung von Gärungsvorgängen wurde das Sammelgefäß täglich mit einer Mischung von Chloroform und Toluol versetzt; außerdem war es zwecks Fernhaltung etwaiger Verunreinigungen mit einem mit Filterpapier bedeckten Trichter versehen.

Vom Tagesharn wurden täglich die *Mengen* und *Reaktion* bestimmt.

Die Reaktion bestimmten wir nach den Vorschriften von *Naegeli*²⁾, also die Azidität mit *Phenolphthalein* als Indikator gegenüber einer n/10 Natronlauge und die Alkaleszenz mit *Alizarin* als Indikator gegenüber einer n/10 Schwefelsäure. Mit Rücksicht darauf, daß die Bestimmung der Harnbestandteile nicht täglich erfolgte, sind in den nachfolgenden Tabellen auch nicht die täglichen Harnmengen und Titrationswerte, sondern bloß Durchschnittszahlen für die entsprechenden Zeiträume angegeben.

Im Mischharn von mehreren Tagen bestimmten wir: *Gesamtstickstoff*, *Harnstoff*, *Ammoniak*, *Aminosäuren* und *Kreatinin*. Harnsäurebestimmungen kommen beim Hunde als wesentlich nicht in Betracht.

Der Stickstoffgehalt wurde nach *Kjeldahl* bestimmt. Harnstoff nach der *Urease-Methode*³⁾, Ammoniak im ersten Versuchsabschnitt nach *Folin*⁴⁾, im zweiten nach *Krüger-Reich-Schittenhelm*⁴⁾, an welche sich gleich die Aminosäurenbestimmung nach *Sørensen*⁴⁾ anschloß. Kreatin und Kreatinin wurden nach *Folin*⁴⁾ mit Hilfe des *Dubosqueschen* Kolorimeters bestimmt.

¹⁾ *Schall* und *Heisler*, Nahrungsmitteltabellen, 2. Aufl.

²⁾ Analyse des Harns, 11. Aufl. des *Neubauer-Huppertschen* Lehrbuchs, 1, 143, 1910.

³⁾ Da die von uns angewandte Modifikation der Methode sehr einfach, aber nicht genügend bekannt ist, sei sie näher beschrieben. 20 g Sojabohnenmehl + 100 ccm Wasser werden nach fünfständigem Stehen filtriert, das Filtrat aa mit Glycerin versetzt (s. *Jansen*, Ber. ü. d. ges. Physiol. 2, 202, 1915), 10 ccm dieser Lösung werden mit 100 ccm Harn und 90 ccm Wasser in den Brutofen gestellt, nachdem vorher die native Harnalkaleszenz gegenüber Methylorange bestimmt wurde. Nach 24 Stunden wird neuerlich die Alkaleszenz bestimmt und aus der Differenz die Menge des aus Harnstoff gebildeten Ammoniaks berechnet. Näheres s. *Fürth*, diese Zeitschr. 60, 452, 1915.

⁴⁾ *C. Neuberg*, Der Harn, 1, 579, 631, 1911; *Neubauer-Huppert*, l. c., 1, 531, 644, 679.

III. Versuchsergebnisse.

Erster Versuchsabschnitt. A. Basische Ernährungsperiode.

Zugeführte Nahrung	N-Gehalt g	Basenüberschuß in mg-Äquivalenten	Wassergehalt g	Kohlhydrate- gehalt g
60 g Milch	0,66	1	42	30,3
150 g Kartoffeln	0,37	9	108	30
100 g Karotten	0,05	9	84	6,9
Wasser	—	—	300	—
Summe:	1,08	19	534	67,2

Ergebnisse der Harnanalyse.

Datum	In 100 ccm Harn in g									
	Harnstoffe			Ammoniak			Aminos			Gesamtkreatinin
	Menge	N	Ges. N ‰	Menge	N	Ges. N ‰	N	Ges. N ‰	Menge	
7. bis 9. XII. 1921	375	6,5	0,07	0,11	0,056	81	0,0083	0,0049	7,1	0,0028
10. " 12. XII. 1921	355	5,3	0,08	0,15	0,07	87	0,0068	0,0056	7	—
12. " 14. XII. 1921	355	4,5	0,1	0,18	0,084	84	0,01	0,008	8	—
15. " 16. XII. 1921	390	3,5	0,12	0,21	0,097	80,8	0,012	0,009	7,5	—
17. " 19. XII. 1921	330	4	0,124	0,25	0,11	85,3	0,006	0,005	4,5	—
20. " 21. XII. 1921	335	3	0,13	0,258	0,12	92	0,007	0,006	5	—
22. " 28. XII. 1921	375	2,5	0,133	0,254	0,121	91	0,0057	0,0047	3,5	—
29. XII. bis 2. I. 1922	420	1,3	0,123	0,244	0,114	92	0,0054	0,0044	3,6	—
3. bis 7. I. 1922	460	1,4	0,121	0,234	0,109	84	0,0102	0,0084	6,5	—
8. " 16. I. 1922	400	1,1	0,114	0,231	0,108	84,3	0,0079	0,0066	5,8	—
Durchschnitt	375	3,3	0,12	—	—	87,8	—	—	5,8	—
										1,2

Körper-
gewicht
kg

1,46

1,7

0,011

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

—

B. Saure Ernährungsperiode.

Zugeführte Nahrung	N-Gehalt g	Säureüberschuß in mg-Äquivalenten	Wassergehalt g	Kohlhydrat- gehalt g
50 g Kuttelfleck	1,15	15	6	—
30 g Roggenbrot	0,17	3	15	14,4
10 g Roggenmehl	0,05	0,25	1,5	7,1
25 g Zucker	—	—	—	25
500 ccm Wasser	—	—	500	—
Summe	1,37	18,25	522	46,5

Ergebnisse der Harnanalyse.

Datum	In 100 ccm Harn in g												Gesamt-kreatinin- Menge		Körper- gewicht kg	
	Harnmenge in ccm	Azidität in ccm	Alkalieszenz in ccm	n/10 H ₂ SO ₄	Harnstoff,			Ammoniak,			Amino-					
					Gesamt-N	Menge	N	N	Menge	N	Ges.-N ‰	N				Ges.-N ‰
26. I. bis 3. II. 1922	330	5,1	30,4	0,406	0,612	0,285	70,2	0,05	0,041	9,8	0,017	4,2	0,022	0,009	2,2	1,83
4. bis 7. II. 1922	305	5	29	0,540	0,540	0,250	71,7	0,047	0,039	12,4	0,012	3,7	—	—	—	—
9. " 11. II. 1922	335	7,1	34	0,424	0,642	0,286	66,7	0,039	0,057	13,3	0,018	4,2	0,022	0,009	2,7	—
12. " 21. II. 1922	312	5,3	36	0,473	0,720	0,336	71	0,068	0,048	10,1	0,018	3,9	—	—	—	—
22. " 27. II. 1922	300	6,3	29	0,409	0,594	0,277	67,7	0,061	0,050	12,2	0,018	4,5	0,021	0,008	1,9	—
28. II. bis 2. III. 1922	240	7	36	0,372	0,517	0,242	67,7	0,058	0,044	13,4	0,015	4,2	—	—	—	—
3. bis 6. III. 1922	285	5,3	33	0,375	0,258	0,258	68,8	0,056	0,048	12,8	0,016	4,3	0,019	0,007	1,9	2,04
Durchschnitt	309	5,9	35,2	0,39	—	—	70,1	—	—	11,6	—	4,1	—	—	2,2	—

Zweiter Versuchsabschnitt.

Hund I: Saure Ernährung. Hund II: Basische Ernährung.

Zugeführte Nahrung	N-Gehalt g	Säure- überschuß in mg-Aequi- valenten	Wasser- gehalt g	Kohle- hydratgehalt g	Zugeführte Nahrung	N-Gehalt g	Basen- überschuß in mg-Aequi- valenten	Wasser- gehalt g	Kohle- hydratgehalt g
50 g Kuttelfleck	1,15	15	6	—	60 g Milch	0,66	1	42	30,3
30 g Roggenbrot	0,17	3	15	14,4	150 g Kartoffeln	0,37	9	108	30
10 g Roggenmehl	0,05	0,25	1,5	7,1	20 g Sojabohnenmehl	1,26	7	10	5
Zucker	—	—	—	25,0	Zucker	—	—	—	—
Wasser	—	—	380	—	Wasser	—	—	240	—
Summe	1,37	18,25	400,0	46,5	Summe	2,29	17	400	65,3

Ergebnisse der Harnanalyse. Hund I: Saure Ernährung.

Datum	In 100 ccm Harn in g										Körper- gewicht kg					
	Harnmenge in ccm	Azidität in n/10 NaOH	Alkalieszenz n/10 H ₂ SO ₄	Harnstoff,		Ammoniak,		Amino,		Gesamtkreatinin,						
				Menge	$\frac{N}{Ges. N}$ %	Menge	$\frac{N}{Ges. N}$ %	N	$\frac{N}{Ges. N}$ %	Menge		N	$\frac{Ges. N}{\%}$			
6. bis 10. VI. 1922	225	3	40	0,45	0,654	0,306	68,2	0,047	0,037	8,4	0,014	3,1	—	—	—	1,77
11. " 13. VI. 1922	210	5,5	36	0,56	0,790	0,369	66	0,071	0,058	14	0,022	3,7	0,0113	0,0042	0,8	—
14. " 19. VI. 1922	280	4,5	28	0,42	0,923	0,431	69,8	0,061	0,05	12,4	0,013	3,2	—	—	—	—
20. " 26. VI. 1922	240	5	27	0,44	0,628	0,246	67	0,089	0,074	17	0,017	3,0	0,0064	0,0037	0,8	—
27. " 30. VI. 1922	255	6,5	23	0,41	0,588	0,277	67,7	0,075	0,067	15,3	0,016	4,1	0,0053	0,0031	0,7	2,65
Hund II: Basische Ernährung.																
6. bis 10. VI. 1922	330	2	44,5	0,36	0,642	0,30	83,4	0,025	0,021	6	0,010	3	—	—	—	2,34
11. " 13. VI. 1922	240	2	44	0,33	0,540	0,262	77	0,024	0,024	7,1	0,011	3,5	0,0148	0,0054	1,8	—
14. " 19. VI. 1922	310	2	55	0,28	0,520	0,243	86,6	0,017	0,014	5,3	0,0089	3,2	—	—	—	—
20. " 26. VI. 1922	330	1,5	70	0,29	0,548	0,266	88,4	0,018	0,015	5,4	0,011	3,9	0,0053	0,0036	1,2	—
27. " 30. VI. 1922	265	2	68	0,31	0,24	0,112	86,9	0,014	0,017	4,8	0,012	3,9	0,0054	0,0036	1,1	2,85

Hund II: Basische Ernährung.

6. bis 10. VI. 1922	225	3	40	0,654	0,306	68,2	0,047	0,037	8,4	0,014	3,1	1,77
11. " 13. VI. 1922	210	5,5	36	0,56	0,790	66	0,071	0,058	14	0,022	3,7	—
14. " 19. VI. 1922	280	4,5	28	0,42	0,923	69,8	0,061	0,05	12,4	0,013	3,2	—
20. " 26. VI. 1922	240	5	27	0,44	0,628	67	0,089	0,074	17	0,017	3,0	—
27. " 30. VI. 1922	255	6,5	23	0,41	0,588	67,7	0,075	0,067	15,3	0,016	4,1	2,65
6. bis 10. VI. 1922	330	2	44,5	0,36	0,642	83,4	0,025	0,021	6	0,010	3	2,34
11. " 13. VI. 1922	240	2	44	0,33	0,540	77	0,024	0,024	7,1	0,011	3,5	—
14. " 19. VI. 1922	310	2	55	0,28	0,520	86,6	0,017	0,014	5,3	0,0089	3,2	—
20. " 26. VI. 1922	330	1,5	70	0,29	0,548	88,4	0,018	0,015	5,4	0,011	3,9	—
27. " 30. VI. 1922	265	2	68	0,31	0,24	86,9	0,014	0,017	4,8	0,012	3,9	2,85

Durchschnittswerte aus der basischen und sauren Ernährungsperiode.
Erster Versuchsabschnitt. Zweiter Versuchsabschnitt.

	Basische Ernährungsperiode (+ 19 mg. Äquivalent.)	Saure Ernährungsperiode (- 88,2 mg. Äquivalent.)		Basisch ernährter Hund (+ 17 mg. Äquivalent.)	Sauer ernährter Hund (- 18,2 mg. Äquivalent.)
Versuchsdauer	40 Tage	40 Tage	Versuchsdauer	26 Tage	26 Tage
Gewichtszunahme . . .	260 g	810 g	Gewichtszunahme . . .	510 g	880 g
Nahrungs-N pro kg Körpergewicht . . .	0,72 g	0,74 g	Nahrungs-N pro kg Körpergewicht . . .	0,74 g	0,74 g
N-Gehalt d. Nahrung . .	1,08 g	1,30 g	N-Gehalt d. Nahrung . .	2,29 g	1,37 g
N-Gehalt des Harns . . .	0,45 g	1,17 g	N-Gehalt des Harns . . .	0,86 g	1,08 g
Harn-N	41 %	90 %	Harn-N	39 %	77 %
Nahrungs-N			Nahrungs-N		
Harnstoff-N	87,8 %	70,1 %	Harnstoff-N	82,4 %	67,8 %
Ammoniak-N	5,8 %	11,6 %	Ammoniak-N	5,7 %	13,4 %
Amino-N	3,4 %	4,1 %	Amino-N	3,5 %	3,6 %
Gesamtkreatinin-N . . .	1,2 %	2,2 %	Gesamtkreatinin-N . . .	1,2 %	0,8 %
Rest-N	2,8 %	12 %	Rest-N	7,2 %	15,2 %
Wassergeh. d. Nahrung .	530 ccm	520 ccm	Wassergeh. d. Nahrung .	400 ccm	400 ccm
Harnmenge	375 "	309 "	Harnmenge	280 "	240 "
Harnmenge			Harnmenge		
Wassergeh. d. Nahrung .	70,2 %	59,2 %	Wassergeh. d. Nahrung .	70 %	60 %
Harnazidität in ccm n/10 NaOH	3,3 %	5,9 %	Harnazidität in ccm n/10 NaOH	2 %	4,9 %
Harnalkaleszenz in ccm n/10 H ₂ SO ₄ . . .	42,2 %	35,2 %	Harnalkaleszenz in ccm n/10 H ₂ SO ₄ . . .	56 %	31 %

IV. Erörterung der Versuchsergebnisse.

Aus den mitgeteilten Tabellen ergeben sich nachfolgende Unterschiede zwischen einem vorwiegend basisch und einem vorwiegend sauer ernährten Hunde.

Der mit einer Nahrung von saurem Charakter genährte Hund zeigt eine *größere Gewichtszunahme* als in der Versuchsperiode, in welcher die Nahrung einen mehr basischen Charakter hatte. Auch von den beiden Hunden des zweiten Versuchsabschnitts, von welchen der eine vorwiegend sauer, während der andere zu gleicher Zeit vorwiegend basisch ernährt wurde, weist der sauer ernährte eine relativ bedeutendere Zunahme des Körpergewichts als der basisch ernährte auf.

Suchen wir den Ursachen für diese Differenz nachzugehen, so finden wir, daß sie nicht durch den verschiedenen *Stickstoffgehalt* der Nahrung bedingt sein kann; denn, obzwar die absoluten Mengen des Nahrungs-N schwankten, so war doch die pro Kilogramm des Körpergewichts berechnete Stickstoffmenge nahezu völlig konstant.

Der Unterschied kann auch nicht durch eine etwa verschieden große *N-Retention* im Organismus bedingt sein, denn diese verhält sich gerade umgekehrt wie die Gewichtsveränderungen. Bei basischer Ernährung scheidet der Hund verhältnismäßig weniger N aus (im

ersten Versuchsabschnitte 41 %, im zweiten 39 % des Nahrungs-N) und hält somit relativ mehr Stickstoff zurück als bei saurer Nahrung, bei welcher 90 % des Nahrungs-N im ersten bzw. 77 % im zweiten Versuchsabschnitt im Harn ausgeschieden wurden.

Es kann dieser Umstand vielleicht als Bestätigung der *Bergschen* Ansicht von der Verschiedenheit des Eiweißbedarfs bei verschiedenem Mineralgehalte der Nahrung hingestellt werden, denn die Annahme wird hierdurch wahrscheinlich, daß zur Erzielung eines N-Gleichgewichts, woran bei unseren jungen, im Wachstum begriffenen Tieren nicht gedacht werden konnte, bei vorwiegend saurer Kostform mehr Stickstoff nötig sein dürfte, als dies bei basischer Kost der Fall ist.

Auch in verschiedenem *Kohlehydratgehalt der Nahrung* kann nicht der Grund für die auffällige Differenz erblickt werden. Denn ihre eiweißsparende Wirkung mag allenfalls in der eben hervorgehobenen größeren N-Retention des basisch ernährten Hundes, dessen Nahrung auch etwas kohlehydratreicher war, zum Ausdruck gekommen sein — für die Gewichtszunahme kann dieser Unterschied nicht maßgebend gewesen sein, denn diese war bei dem kohlehydratärmer ernährten Tieren der sauren Versuchsperioden größer.

Auf Grund unserer Versuche können wir dafür nur die verschiedene *Wasserretention* verantwortlich machen. Bei *saurer Ernährung* schied der Hund des ersten Versuchsabschnitts bei gleicher Flüssigkeitszufuhr trotz des inzwischen erfolgten Wachstums *weniger Harn* aus als in der vorangegangenen basischen Versuchsperiode (59,2 % der eingenommenen Flüssigkeit in der sauren, gegenüber 70,2 % in der basischen Periode). Auch im zweiten Versuchsabschnitte liegen die Verhältnisse ähnlich: Der basisch ernährte Hund schied etwa 70 %, der sauer ernährte nur etwa 60 % der eingenommenen Flüssigkeit mit dem Harn aus. Trotzdem der sauer ernährte Hund zu Beginn der Versuche um mehr als ein halbes Kilogramm an Gewicht hinter seinem Zwillingsbruder zurückgestanden war, war am Schlusse der Versuchsperiode das Gewicht der Tiere nur wenig verschieden. Es ist dies um so auffallender, als der basisch ernährte Hund, wie übrigens auch der Hund des ersten Versuchsabschnitts, während seiner basischen Ernährungsperiode relativ mehr Stickstoff retiniert hatte und überdies durch einen etwas größeren Kohlehydratgehalt der Nahrung auch quantitativ besser ernährt worden war.

Die *Gewichtszunahme durch Wasserretention* ist eine den Physiologen und insbesondere auch den Pädiatern wohlbekannte Tatsache. So berichten *Voit* und *Bischof*¹⁾ über einen Hund, der bei 41tägiger ausschließlicher Broternährung im Harn eine N-Menge entsprechend 3717 g Fleisch ausgeschieden und hierbei nur 531 g abgenommen hat. *Voit* gibt ferner an,

¹⁾ *Voit*, in Hermanns Handb. d. Physiol. 6 (1), 347.

daß bei zwei Katzen, welche längere Zeit ausschließlich mit Brot gefüttert worden waren, die Muskeln und das Gehirn einen um 3 bis 4% höheren Wassergehalt zeigten als die entsprechenden Organe von Kontrolltieren¹⁾.

Auch seitens der Pädiater liegen Untersuchungen vor, welche den großen Einfluß der Wasserausscheidung auf die Gewichtsverhältnisse darstellen. Wir erwähnen die Arbeiten von *Tobler*²⁾, *Weigert*³⁾, *Lederer*⁴⁾.

Nun ist es bekannt, daß durch bloße *Zufuhr von Flüssigkeit* keine Retention erzielt werden kann, sondern daß Nahrungsbestandteile vorhanden sein müssen, die das Wasser binden, so daß durch deren Retention im Körper auch das Wasser zurückbehalten wird. Bei vollständigem Hunger kommt es nicht zur Wasseranreicherung⁵⁾.

Die Ansichten über die ätiologischen Faktoren, welche bei der Wasserretention in Betracht kommen, gehen aber auseinander.

*Rubner*⁶⁾ stellte das Wasserausscheidungsvermögen in eine gewisse antagonistische Beziehung zur *Fettablagerung* im Körper, so daß eine fettarme Nahrung zu einer stärkeren Wasserretention führe als eine fettreiche.

In einem gewissen Gegensatz dazu glaubte *Voit*⁷⁾ eine vermehrte Wasserretention auf einen besonderen *Kohlehydratreichtum* der Nahrung zurückführen zu sollen.

Nach *Freund*⁸⁾ sind jedoch die *Salze* der Nahrung in erster Linie für das Zurückbleiben des Wassers im Organismus maßgebend.

Aus unseren Versuchen läßt sich vielleicht der Schluß ableiten, daß *Salze von saurem Charakter in höherem Maße retinierend wirken, als solche basischer Natur*, welche Annahme durch anderweitige pathologische Erfahrungen bis zu einem gewissen Grade gestützt wird.

So wissen wir, daß Kaninchen durch Zufuhr größerer Säuremengen fast anurisch werden⁹⁾. Da das Überwiegen der sauren Salze in der Nahrung auch sonst gewissermaßen im kleinen die Verhältnisse, die bei der Säurevergiftung bestehen, nachbildet, so ist unser Ergebnis, nämlich die durchschnittlich geringere Tagesharnmenge bei saurer Ernährung, vielleicht gleichsinnig zu deuten.

So heißt es auch bei *Fürth*: „Die *Säurebildung* und die durch dieselbe bewirkte *Quellung* ist als eines der Momente, welche bei der Flüssigkeitsretention in den Geweben mitwirken, in Betracht zu ziehen¹⁰⁾“.

Es ist denn auch möglich, daß die oben mitgeteilten Versuche von *Voit*, bei welchen *einseitige Broternährung* zur Wasserretention führte, auf das Überwiegen saurer Salze im Brot (vgl. S. 483) zurückzuführen sind.

¹⁾ l. c., S. 348.

²⁾ *Tobler*, Jahrb. f. Kinderheilk. 73, 56, 1911.

³⁾ *Weigert*, ebendasselbst 61.

⁴⁾ *R. Lederer*, Zeitschr. f. Kinderheilk. 10.

⁵⁾ *Voit*, l. c., S. 348.

⁶⁾ *Rubner*, in Leydens Handb. d. Ernährungstherap. 1.

⁷⁾ *Voit*, l. c.

⁸⁾ *Freund*, Jahrb. f. Kinderheilk. 59, 1904.

⁹⁾ *K. Spiro*, Beitr. z. chem. Phys. u. Path. 1, 270; *H. Elias*, Zeitschr. f. Biol. 48, 1913.

¹⁰⁾ *Fürth*, Probleme d. physiologischen u. pathologischen Chem. 1, 256.

Vielleicht sind auch die als „*Mehlnährschäden*“ von den Pädiatern aufgefaßten hydropischen Flüssigkeitsansammlungen im Bindegewebe und hypertonen Quellungs Zustände der Muskulatur, zum Teil wenigstens, auf den sauren Charakter der Mehle zurückzuführen¹⁾.

Andererseits mag vielleicht mit dem alkalischen Charakter vieler Vegetabilien, z. B. der *Kartoffel*, ihre Verwendung als *Diuretica*, insbesondere auch bei Nierenkrankheiten im Zusammenhang stehen²⁾.

Will man sich die physikalisch-chemischen Vorgänge bei der durch Säuren bewirkten Wasserretention theoretisch zurechtlegen, so kann man sich darüber vielleicht folgende Vorstellung bilden: Zur Wahrung der neutralen Reaktion kommen neben verschiedenen Puffersalzen (wie den einfach und mehrfach basischen Alkalicarbonaten und -phosphaten) aller Wahrscheinlichkeit nach auch die *Aminogruppen der Eiweißkörper* in Betracht, welche als Amoniakreste neutralisierend zu wirken vermögen.

Sobald aber ein Eiweißmolekül sich mit einem Säureradikal beladen hat, erhält es, wie aus den Arbeiten *W. Paulis* und anderer zur Genüge hervorgeht, eine elektrische Ladung, wird ionisiert und gerät, indem es sich mit einer Hülle von Wassermolekülen belädt, in einen Zustand der *Quellung*.

Was die sonstigen Unterschiede in bezug auf die *Eigenschaften und Zusammensetzung des Harns* unserer Versuchstiere anbelangt, so finden wir diesbezüglich übersichtlichere Verhältnisse. Der Harn des *sauer* ernährten Hundes zeigt im ersten und im zweiten Versuchsabschnitte einen *höheren Aziditäts- und geringeren Alkaleszenzgrad* als der des basisch ernährten. Es sinken die Aziditätswerte bei basischer Kost, während zugleich die Alkaleszenzwerte ansteigen. Dreimal fanden wir den Harn unserer Hunde bei basischer Ernährung sogar gegenüber Phenolphthalein alkalisch. In der Regel war zwar der Harn dem gewöhnlichen Lackmuspapier gegenüber sauer, dagegen reagierte er gegenüber einer neutralen reinen Lackmuslösung, wenn die Nahrung einen Basenüberschuß enthielt, meist schwach bis deutlich alkalisch³⁾.

Die Ergebnisse bezüglich der *Verteilung des Harnstickstoffs* entsprechen vollständig den Mitteilungen von *Berg*. Es tritt eine ganz auffällige Verschiebung in den Mengenverhältnissen der verschiedenen N-haltigen Harnbestandteile zutage, wenn sie auch in unseren Versuchen nicht so hochgradig ist, wie sie von *Berg* und von *Fuhge* angegeben worden ist, bei *Fuhge* allerdings unter dem Einfluß von sauren Salzen, welche der Nahrung zugesetzt worden waren⁴⁾. Aber auch

¹⁾ *Lederer*, l. c., S. 466.

²⁾ *F. Vidal* u. *A. Lemierre*, *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.* 10.

³⁾ *Berg*, *Münch. med. Wochenschr.* 1917, S. 25.

⁴⁾ Nach *Berg* kann der Harnstoffgehalt bis auf die Hälfte sinken (l. c.). *Fuhge* fand bei Kindern unter dem Einfluß von 3 g Calcium chloratum bis 26 % Ammoniak (l. c., S. 303). Noch unveröffentlichte Versuche an Hunden, die in diesem Laboratorium von *C. Ausenda* ausgeführt worden sind, sprechen im gleichen Sinne.

unsere Tiere zeigen ganz deutlich den eminenten Einfluß des verschieden gearteten Mineralgehalts der Nahrung auf die Verteilung des Harnstickstoffs.

Bei *basischer Ernährung* entfallen in unserem ersten Versuchsabschnitte 87,8 %, im zweiten 82,4 % des gesamten Harn-N auf *Harnstoff* und nur 4,8 % im ersten bzw. 5,7 % im zweiten Versuchsabschnitte auf *Ammoniak*. Völlig andere Werte finden wir diesbezüglich bei *saurer Ernährung*. Unter dem Einfluß einer solchen Kost sank im ersten Versuchsabschnitte der *Harnstoff-N* auf 70,1 %, während zugleich der *Ammoniak-N* eine Steigerung auf 11,6 erfuhr. Der sauer ernährte Hund des zweiten Versuchsabschnitts weist ebenfalls eine gleichsinnige Veränderung der diesbezüglichen Werte auf. In seinem Harn macht der *Harnstoff-N* nur 67,8 %, dagegen der *Ammoniak-N* 13,4 % des gesamten Harn-N aus.

Nicht so eindeutig liegen die Verhältnisse bezüglich des *Amino-N*, der nach *Berg* bei saurer Ernährung auf Kosten des Harnstoffs ebenfalls zunehmen soll. Im ersten Versuchsabschnitte fanden wir bei basischer Ernährung 3,4 %, bei saurer 4,1 %. Diese geringfügige Differenz verschwand aber fast vollständig im zweiten Versuchsabschnitte, in welchem sich 3,5 % bei basischer, 3,6 % bei saurer Kost fanden.

Auch die Veränderungen des *Kreatinin-N* lassen eine Eindeutigkeit vermissen. Präformiertes Kreatin enthielt der Harn unserer Hunde überhaupt nur in kaum nachweisbaren Spuren, das Wesentliche war stets das durch Hydrolyse gewonnene Kreatinin. Seine Beteiligung am Gesamtstickstoff des Harns war aber schwankend. Im ersten Versuchsabschnitte überwog das Kreatinin des sauren, im zweiten wies dagegen der basisch ernährte Hund mehr Kreatinin auf.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Versuche zusammen, so ergibt sich aus ihnen folgendes:

1. Beim Überwiegen saurer Salze in der Nahrung erfolgt, vermutlich infolge stärkerer *Wasserretention* eine bedeutendere *Gewichtszunahme* als bei vorwiegend basischer Ernährung.
2. Bei gleichem Nahrungs-N verläuft die *Stickstoffausscheidung* im entgegengesetzten Sinne wie die Wasserausscheidung, sie ist niedriger bei basischer als bei saurer Ernährung.
3. Die *N-Verteilung* im Harn erleidet unter dem Einflusse verschieden gearteter Mineralsalze in der Nahrung eine weitgehende Verschiebung. Bei basischer Ernährung weist der Harn verhältnismäßig mehr Harnstoff und weniger Ammoniak auf als bei saurer. Parallel damit geht eine Änderung der Harnreaktion vor sich; je alkalischer der Harn ist, um so harnstoffreicher und ammoniakärmer ist er zugleich. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei zunehmender Azidität.

Die quantitative Analyse der Knochenasche bei Kriegsosteopathie.

Von
Wilhelm Loll.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität
und der III. medizinischen Abteilung des Kaiser-Franz-Josef-Spitals in
Wien.)

(Eingegangen am 10. November 1922.)

Im letzten Kriegsjahre und in den beiden folgenden Jahren kamen in Wien eine große Anzahl von Knochenerkrankungen zur Beobachtung, die in ihren klinischen Erscheinungen lebhaft an die Osteomalacie erinnerten. Am 20. Februar 1919 fand in der Gesellschaft für innere Medizin und Kinderheilkunde in Wien eine Aussprache über diese Erkrankung statt, bei welcher *H. Schlesinger* den einleitenden Vortrag hielt¹⁾. Seitdem hörten wir auch aus dem Reiche, insbesondere aus den größeren Städten, daß auch dort diese Knochenerkrankung mehr oder minder gehäuft auftrate, wenngleich es den Anschein hat, daß Wien den traurigen Vorzug genießt, auf besonders viele und schwere Fälle dieser Art hinweisen zu können.

Ein Zusammenhang der Osteopathie mit dem Ernährungselend, unter dem zu dieser Zeit die breitesten Schichten der Bevölkerung in beispielloser Weise gelitten hatten, steht wohl außer jeder Frage. Die Pathogenese jedoch liegt noch im Unklaren, man ist derzeit über Hypothesen noch nicht hinausgekommen.

Um nun in das Wesen der Erkrankung Einblick zu gewinnen, schien es uns vor allem notwendig, die *chemische Zusammensetzung der Knochenasche* kennen zu lernen. Insbesondere handelte es sich darum, die Relation der Hauptbestandteile des anorganischen Stützgewebes CaO , P_2O_5 und MgO kennen zu lernen, um Abweichungen von der Norm festzustellen; auch sollten die gefundenen Werte mit den bereits bekannten Zahlen, welche bei der Vorkriegsosteomalacie und Rachitis gefunden worden waren, in Vergleich gestellt und derart Einblick gewonnen werden, ob — in chemischer Beziehung — ein Parallelismus oder doch eine Analogie zu den letzterwähnten Erkrankungen besteht.

¹⁾ Wien. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 10.

Schon die bloße Betrachtung der erkrankten Knochen zeigte uns, daß die absolute Menge der Knochensubstanz stark verringert ist. Zweifellos handelt es sich in diesen Fällen auch um eine Verschiebung der Relation zwischen anorganischen und organischen Bestandteilen, ähnlich wie dieselbe bei anderen Knochenerkrankungen vielfach gefunden worden ist. Wir verweisen diesbezüglich auf die Angaben von *H. G. Wells*¹⁾: Bei der Osteomalacie ist das Verhältnis der anorganischen Salze im Knochen auf 20 bis 40 % reduziert gegenüber 56 bis 60 % im normalen Knochen der Erwachsenen; bei der Rachitis betragen die anorganischen Bestandteile 19 bis 34 % gegenüber 64 bis 65 % im normalen Knochen der Kinder. Nach *Gassmann*²⁾ ist der Unterschied allerdings kein so gewaltiger. Er fand 57 bis 58 % anorganische Substanz im getrockneten Knochen gegenüber 62 bis 63 % in der getrockneten Knochensubstanz normaler Kinder. Bei einem von uns daraufhin untersuchten Falle fanden wir die anorganischen Bestandteile bei Beckenknochen und Rippen auf 52,37 bis 56,25 % vermindert.

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf vier Fälle schwerer Kriegsosteopathie, von welchen Rippen, Becken und Tibia gesondert der Untersuchung zugeführt wurden. Der Kontrolle halber wurden in allen Fällen Doppelanalysen angestellt.

I. Klinisches und Obduktionsbefund.

Aus Klinik und Obduktionsbefund sei hier nur so viel mitgeteilt, als zur Charakterisierung der Skeletterkrankung notwendig erscheint.

A. M. P., 44 Jahr, aufgenommen 11. Mai 1920, gestorben 27. Mai 1920. Seit etwa 1 Jahr stechende Schmerzen in Rippen und Brustbein, geringere in den Hüften. In letzter Zeit haben die Schmerzen derart zugenommen, daß Patientin bettlägerig wurde. Seit Januar 1920 Amenorrhö, starke Abmagerung.

Hochgradig abgemagerte Patientin, intensive Druckempfindlichkeit des Sternums und der Rippen, letztere besonders bei seitlicher Kompression. Mäßige Kyphose der Brustwirbelsäule. Das Becken zeigt Symphysenschnabel, ist bei seitlicher Kompression stark druckempfindlich, es besteht Adduktorensperre. Tibien nur ganz leicht klopfempfindlich.

Obduktionsbefund: Mäßige Kyphose der Brustwirbelsäule. Die Rippen und das Sternum sind brüchig und weich, für die Schere leicht schneidbar. Symphysenschnabel.

B. Th. B., 53 Jahr, aufgenommen 15. Mai 1920, gestorben 20. Mai 1920. Seit etwa 1 Jahre Schmerzen in den Hüften, in Schultern und Rippen. Seit 4 bis 5 Monaten bemerkt Patientin, daß sie kleiner wird. Seit einem halben Jahr ist sie bettlägerig. Klimakterium vor 8 Jahren. Während des Krieges ist Patientin stark abgemagert (von 54 auf 37 kg).

Es handelt sich um eine kleine, schlecht genährte Patientin mit starker Kyphose der oberen Brustwirbelsäule, wodurch der obere Teil derselben

¹⁾ Chemical Pathology, S. 373. Philadelphia und London 1907.

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 163, 1910.

fast horizontal steht; der Thorax ist dadurch in seinem Höhenmaße stark reduziert, kaum 30 cm hoch. Sternum und Rippen sind außerordentlich druckempfindlich, der Thorax ist leicht kompressibel. Das Becken ist osteomalacisch deformiert: deutlicher Symphysenschnabel, breit ausladende federnde Beckenschaufeln, Promontorium nicht erreichbar; mäßige Adduktorensperre. Tibien nur wenig druckempfindlich, leichte Genua valga.

Obduktionsbefund: Hochgradige Osteomalacie, besonders der Rippenknochen, diese sind für das Messer leicht schneidbar. Hochgradige anguläre Kyphose der Brustwirbelsäule. Becken federnd, Symphysenschnabel, Conjugata verlängert. Bei näherer Betrachtung des Skelettes ergab sich, daß die Rippen sehr leicht verbiegbare waren und schließlich ohne Knacken zerbrachen; sie waren seitlich abgeflacht. Nach Befreiung vom Periost, dem blutreichen Mark und der Spongiosa blieb die Corticalis in der Dicke von stärkerem Pergamentpapier zurück. Auch Sternum und Beckenknochen waren leicht schneidbar. Die Spongiosa der letzteren schien grobmaschiger und war auffallend weich. Sie enthielt Fettmark. An den Extremitäten bestand — abgesehen von leichten Genua valga — keine Deformation. Die Corticalis von Femur, Tibia und Fibula war verschmälert gegenüber der Norm; die Spongiosa war etwas weicher; sie enthielt gelbes Fettmark, in welches etwa kirschgroße Herde roten Markes eingesprengt waren.

C. M. H., 71 Jahr, aufgenommen 7. März 1920, gestorben 12. August 1920.

Seit Herbst 1919 Knochenschmerzen, die immer mehr zunahmen. Das Gehen wurde immer schmerzhafter, seit dem Winter ist Patientin bettlägerig und trat schwere Thoraxdeformation auf. Klimakterium vor 24 Jahren. Zwei normale Partus, zwei Abortus. Patientin ist sehr stark abgemagert.

Senile, kleine, ausgesprochen kachektische Patientin (Körpergewicht 28,55 kg) mit schlaffer, anämischer Haut. Schwere Kyphose der Brustwirbelsäule und beträchtliche dachartige Vortreibung der vorderen Thoraxwand von der Ansatzstelle der dritten Rippe. Jeder geringste Versuch, die Lage zu wechseln, bereitet der Patientin die heftigsten Schmerzen. Sämtliche Knochen sind hochgradig druckschmerzhaft, besonders Rippen, Sternum und Becken. Die Rippen sind auffallend weich, leicht einbiegbar. Das Becken ist leicht kompressibel, es besteht deutlicher Symphysenschnabel und Adduktorensperre. Die horizontalen Schambeinäste verlaufen unter spitzem Winkel, das Promontorium ist nicht erreichbar. Beckenmaße: Spinae 23, Cristae $25\frac{1}{2}$, Trochanteren 27, Beckenausgang: querer Durchmesser 9, gerader Durchmesser 9 cm.

Obduktionsbefund: Osteomalacische Veränderungen am Skelett mit hochgradig osteomalacischer Verbildung des Beckens und der Wirbelsäule. Zahlreiche fibrös ausgeheilte Spontanfrakturen in den Rippenknochen. Die Rippen sind seitlich abgeflacht, fast wachweich, sehr leicht verbiegbare und brechen schließlich ohne Knacken. Die Corticalis hat die Dicke stärkeren Pergamentpapiers, das Mark ist von dunkelroter Färbung. Auch Sternum und Becken sind sehr weich, leicht verbiegbare und lassen sich sehr leicht schneiden. Die Spongiosa des Beckens ist großmaschig und leicht eindrückbar. Die Corticalis der langen Röhrenknochen, welche nicht deformiert sind, ist reduziert, die der Tibien kaum 3 mm stark. Auch hier findet sich eine etwas weitmaschigere, leichter eindrückbare Spongiosa. Im Innern sieht man gelbes Fettmark, in welches zahlreiche kirschgroße und kleinere Herde von rotem Gallertmark eingesprengt sind.

D. M. N., 73 Jahr, aufgenommen 3. Mai 1920, gestorben 26. Juli 1920. Seit etwa 1 Jahre besteht hochgradige Schwäche, Kreuz- und Rippen-schmerzen, welch letztere besonders in letzter Zeit sehr heftig wurden. Klimax vor 25 Jahren, 10 normale Partus.

Kleine, schlecht genährte, kachektische Patientin. Nicht sehr hochgradige Kyphose der Brustwirbelsäule. Sternum, Rippen und Becken sehr druckempfindlich, am letzteren besonders die Schambeinäste. Mäßiger Symphysenschnabel. Geringe Federung des Beckens und leichte Adduktoren-sperre. Beckenmaße: Spinae 26, Cristae 28, Trochanteren 30, gerader Becken-ausgang im Durchmesser 10, querer $10\frac{1}{2}$ cm. Tibien nicht druckempfindlich.

Obduktionsbefund: Mäßige Kyphose der Brustwirbelsäule. Die Rippen lassen sich mit dem Messer gut schneiden, sind weicher, leicht abbiegbar und brechen schließlich mit leichtem Knacken. Die Kortikalis ist reduziert, das Mark blutreich. Auch das Sternum ist weicher und leicht schneidbar. Am Becken, welches etwas federt, findet sich — abgesehen von einem mäßigen Symphysenschnabel — keine Deformation. Die Corticalis der Beckenknochen, sowie die der langen Röhrenknochen ist mäßig verschmälert. Letztere enthalten reines Fettmark.

II. Methode.

Nach gründlicher Befreiung der Knochen von Periost und Mark und nach gutem Abspülen in fließendem Wasser wurden die Knochen getrocknet. Hierauf wurden sie im Mörser gestampft und schließlich in einer Reibschale zu feinstem Pulver zerrieben.

Die Veraschung des Knochenpulvers erfolgte nach *Gabriel*¹⁾. 15 bis 20 g Substanz wurden in einem *Erlenmeyerschen* Kölbchen mit 100 g Glycerin-lauge (30 g Ätzkali in 1000 ccm Glycerin) übergossen, das Knochenpulver durch Schütteln im Glycerin gleichmäßig verteilt und das Gemenge unter häufigem Umschütteln — um ein Übersäuern zu vermeiden — allmählich bis 200° erhitzt. Auf dieser Temperatur wurde es etwa $1\frac{1}{2}$ Stunden erhalten und hierauf, nachdem auf 150° abgekühlt worden war, in eine Porzellanschale, die beiläufig 1 Liter kochendes Wasser enthielt, gegossen. Hierauf wurde gut verrührt, nach Sedimentierung die überstehende Flüssigkeit mit einem mit Leinwand überspannten Heber abgezogen, wieder mit kochendem Wasser übergossen und dieser Vorgang so oft wiederholt, bis das Waschwasser keine Spur alkalischer Reaktion mehr zeigte. Der Rückstand wurde auf ein Nutschfilter gebracht, gut getrocknet und geglüht; beim Glühen trat niemals eine Spur von Bräunung auf. Die angegebene Veraschungsmethode bezweckt die Zerstörung und Entfernung der organischen Substanz, die beim Glühen eine Reduktion der Phosphorsäure zur Folge haben könnte.

Quantitative Bestimmung des Calciums, Magnesiums und der Phosphorsäure: Die getrocknete, abgewogene Aschenmenge wurde in Salzsäure gelöst, mit Ammoniak gefällt und der Niederschlag wiederum in Essigsäure gelöst. Zu der klaren, eventuell filtrierten Flüssigkeit wurde Ammoniumoxalat im Überschuß zugesetzt, 24 Stunden in der Wärme stehen gelassen und der Niederschlag abfiltriert; hierauf wurde mit heißem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat vollkommen chlorfrei war. Nun wurde der Niederschlag in noch feuchtem Zustande in einen Platintiegel gebracht, geglüht und nach vorsichtigem Verbrennen über dem Gebläse als *Calciumoxyd* gewogen.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 275, 1894.

Filtrat und Waschwasser wurden nun auf dem Wasserbade eingengt und diese Lösung in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte diente zur Bestimmung des *Magnesiums*, die andere zur Bestimmung der *Phosphorsäure*.

Zwecks Feststellung des *Magnesiumgehalts* wurde die Flüssigkeit mit Ammoniak stark übersättigt und nach Zusatz von etwas Ammoniumcitrat mit Natriumphosphatlösung gefällt. Nach 24stündigem Stehen wurde filtriert, mit 2,5proz. Ammoniak ausgewaschen, der Niederschlag getrocknet

III. Analysen.

Eigene Untersuchungen.

	Analysierte Aschenmenge	Ca O		Mg O		P ₂ O ₅		Rest
		g	%	g	%	g	%	
		g	%	g	%	g	%	
I. Normale Knochenasche:								
I.	3,630	1,878	51,8	0,028	0,78	1,408	38,8	8,62
II.	3,630	1,880	51,8	0,031	0,84	1,404	38,7	8,66
III.	3,630	1,838	52,1	0,029	0,83	1,372	38,9	8,57
IV.	1,824	0,947	51,9	0,016	0,85	0,706	38,7	8,55
A. M. P.		II. Osteopathie:						
Rippen { I	2,349	1,480	63,0	0,018	0,78	0,752	32,0	4,32
{ II	1,738	1,097	63,1	0,013	0,76	0,558	32,1	4,04
Becken { I	3,533	2,444	69,2	0,027	0,75	0,915	25,9	4,15
{ II	2,672	1,851	69,3	0,021	0,77	0,689	25,8	4,13
Tibia { I	4,606	2,515	54,6	0,037	0,80	1,686	36,6	8,00
{ II	3,423	1,876	54,8	0,028	0,81	1,249	36,5	7,89
B. Th. B.								
Rippen { I	0,4947	0,281	56,8	0,0039	0,78	0,185	37,3	5,12
{ II	0,4725	0,270	57,1	0,0037	0,78	0,175	37,1	4,92
Becken { I	0,7385	0,500	67,7	0,0055	0,74	0,191	25,8	5,76
{ II	0,5980	0,406	67,9	0,0047	0,79	0,154	25,7	5,61
Tibia { I	2,0690	1,128	54,5	0,017	0,81	0,747	36,1	8,59
{ II	2,4500	1,338	54,6	0,019	0,78	0,890	36,3	8,32
C. M. H.								
Rippen { I	0,2471	0,158	64,0	0,0019	0,78	0,074	30,1	5,12
{ II	0,3724	0,238	63,9	0,0030	0,80	0,113	30,2	5,10
Becken { I	0,6349	0,430	67,8	0,0048	0,75	0,163	25,6	4,85
{ II	0,5572	0,378	67,8	0,0043	0,78	0,143	25,7	4,72
Tibia { I	0,8792	0,480	54,6	0,0070	0,80	0,320	36,4	8,20
{ II	1,4381	0,788	54,8	0,0111	0,77	0,525	36,5	7,93
D. M. N.								
Rippen { I	2,1780	1,381	63,4	0,0163	0,75	0,675	31,0	4,85
{ II	1,9170	1,223	63,8	0,0142	0,74	0,581	30,3	5,16
Becken { I	0,8050	0,616	76,5	0,0060	0,80	0,129	16,2	6,50
{ II	1,2182	0,936	76,8	0,0100	0,80	0,199	16,3	6,10
Tibia { I	0,8431	0,460	54,6	0,0067	0,80	0,309	36,6	8,00
{ II	0,8563	0,469	54,8	0,0068	0,79	0,315	36,8	7,61

und in einem Porzellantiegel verascht, in dem zunächst sehr allmählich erhitzt, schließlich über dem Gebläse stark geglüht wurde. Zuletzt wurden einige Tropfen Salpetersäure hinzugefügt, bis die Substanz völlig weiß blieb, hierauf getrocknet, abermals geglüht und als Magnesiumpyrophosphat gewogen.

Die *Phosphorsäure* bestimmten wir auf titrimetrischem und auf gewichtsanalytischem Wege.

Titrimetrische Methode: Die Hälfte des eingeeengten Filtrats von der Calciumoxalatfällung wurde in ein Kölbchen gegossen, hierauf wurden 5 ccm Natriumacetat hinzugefügt und nun wurde unter Aufkochen mit Uranacetat titriert, bis ein dem Gemenge entnommener Tropfen mit einem Tropfen 10proz. Ferrocyankalium vermengt, Bräunung zeigte. Zwecks *gewichtsanalytischer Bestimmung* wurde noch etwas Uranacetat im Überschuß zugesetzt, nach Sedimentierung des Niederschlags filtriert und so lange mit 10proz. Essigsäure ausgewaschen, bis das Filtrat mit Ferrocyankalium keine braune Färbung mehr gab, bis also das überschüssige Uranacetat gänzlich entfernt war. Der Niederschlag wurde sodann im Platintiegel über dem Gebläse geglüht und als Uranphosphat gewogen [vgl. *Wellmann*¹⁾].

IV. Ergebnisse.

Bevor wir zur Besprechung unserer Analysenresultate übergehen, wollen wir der Zusammensetzung der normalen Knochenasche und der bei Rachitis und Osteomalacie Erwähnung tun.

Betreffs der Zusammensetzung normaler Knochenasche verweisen wir auf *R. Neumeister*²⁾, der die von *Zalesky* durch Analyse zahlreicher menschlicher Knochen festgestellten Mittelwerte auf CaO, MgO und P₂O₅ umgerechnet hat. Er gelangte hierbei zu folgenden Resultaten: CaO = 52,83 %, MgO = 0,48 %, P₂O₅ = 38,73 %. *Gabriel*³⁾ gibt für den normalen menschlichen Oberarm folgende Werte an: CaO = 51,31 %, MgO = 0,77 %, P₂O₅ = 36,65 %. Wir selbst gelangten — wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist — bei der Analyse normaler Knochenasche zu analogen Resultaten.

Normalerweise ist die Aschenzusammensetzung aller Skeletteile dieselbe; *Schrodt*⁴⁾ brachte den Nachweis, daß das Verhältnis der einzelnen Aschenbestandteile im Knochen des Menschen und der verschiedensten Tiere annähernd konstant ist. Er stellte für die Knochenasche von Mensch und Hund fast die gleichen Analysenwerte fest:

	Mensch %	Hund %
CaO	51,31	52,91
MgO	0,77	0,80
P ₂ O ₅	36,65	39,62
CO ₂	5,86	5,54

¹⁾ Pflügers Arch. 121, 511, 1908.

²⁾ Lehrbuch für physiol. Chemie, II. Teil, 1895.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 281, 1894.

⁴⁾ Landw. Versuchsstat. 19, 343.

Ferner untersuchte er verschiedene Skeletteile des Hundes getrennt und fand auch hier weitgehende Übereinstimmung:

	Tibia %	Becken %	Rippen %
CaO	53,01	53,28	52,92
MgO	0,84	0,90	1,05
P ₂ O ₅	39,96	39,85	39,96
CO ₂	5,35	5,47	5,74

Aus diesen Angaben ist einwandfrei ersichtlich, daß auch bei Menschen normalerweise kein wesentlicher Unterschied in der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Skeletteile besteht. Auch das Alter hat auf die Relation der Aschebestandteile keinen Einfluß, wie *Wildt*¹⁾ an Kaninchen im Alter von 1 Tag bis zu 4 Jahren nachgewiesen hat.

Betrachten wir nun die — allerdings spärlich vorhandenen — Befunde bei der Osteomalacie, so finden wir in der Literatur folgende Angaben:

I. Galiman und *P. König*²⁾ untersuchten die Knochen in einem Falle von infantiler Osteomalacie und kamen zu folgenden Resultaten: Ossein = 55,03 %, Ca₃(PO₄)₂ = 38,07 %, CaCO₃ = 6,38 %, Mg₃(PO₄)₂ = 0,49 %. Nach Abzug der organischen Substanz lassen sich folgende Relationen in der Knochenasche berechnen: Ca₃(PO₄)₂ = 84,73 %, CaCO₃ = 14,2 %, Mg₃(PO₄)₂ = 1,1 % oder umgerechnet CaO = 53,95 %, P₂O₅ = 39,20 %, MgO = 0,49 % und CO₂ = 6,27 %. *F. H. McCrudden*³⁾ untersuchte zwei osteomalacische Pferderippen und fand in einem Falle 62,86 % organische Substanz, CaO 20,09 %, MgO 0,5 % und P₂O₅ 16,55 %, im anderen 65,19 % organische Substanz, CaO 18,35 %, MgO 0,46 % und P₂O₅ 16 %. Läßt man die organische Substanz außer Betracht und berechnet man die erhobenen Werte auf ihre prozentuelle Verteilung in der Knochenasche, so erhält man für den ersten Fall CaO = 50 %, MgO = 1,35 % und P₂O₅ = 44,57 %, für den zweiten CaO = 52,71 %, MgO = 1,32 % und P₂O₅ = 45,96 %. Völlig unkontrollierbar, offenbar durch sinnstörende Druckfehler verzerrt, sind die Analysenresultate von *Cappezuoli*⁴⁾, aus denen nur so viel zu entnehmen ist, daß die Verminderung des Calciums stärker ist als die des Magnesiums, und daß die chemischen Veränderungen in den flachen Knochen ausgesprochener sind als in den langen.

Für die Rachitis lassen sich aus *Gassmanns* (l. c., S. 163) Analysen folgende Werte berechnen: CaO = 52,34 %, MgO = 1,54 % und P₂O₅ = 39,56 %, also normale Werte für CaO und P₂O₅ und eine relative Vermehrung des Magnesiums, ein Befund, der auch in dem oben zitierten Falle bei der Analyse einer osteomalacischen Pferderippe von *McCrudden* erhoben wurde. Wenn aber *Gassmann* (l. c.) den Schluß zieht, daß vermehrter Magnesiumgehalt eine Prädisposition für Knochenerkrankungen schaffe, so können wir dem aus a. a. O. noch näher zu erörternden Gründen nicht zustimmen.

Wir kommen nun zur Besprechung unserer Befunde bei der Kriegoosteopathie. Wir konnten in Analogie zu den Verhältnissen bei Rachitis

¹⁾ Zitiert nach *Neumeister*, l. c. (6).

²⁾ Zitiert nach *Chem. Zentralbl.* 1, 1332, 1905.

³⁾ *Amer. Journ. of Physiol.* 17, 32—34, 1906.

⁴⁾ Diese Zeitschr. 16, 355, 1909.

und Osteomalacie und abweichend von der Norm für Becken- und Rippenknochen eine Verminderung der anorganischen Substanz zugunsten der organischen Bestandteile feststellen; wir fanden bei den Rippen in dem entfetteten und getrockneten Knochenpulver 54,07 bis 56,25 % anorganische Substanz, bei den Beckenknochen 52,37 bis 53,28 %, während wir bei den Tibien normale Verhältnisse, nämlich 66,49 bis 66,87 % anorganische Substanz feststellen konnten. Während hingegen die Zusammensetzung der Asche, das ist das Verhältnis von $\text{CaO} : \text{P}_2\text{O}_5 : \text{CO}_2$ bei Rachitis und Osteomalacie von der des normalen Knochens im allgemeinen nicht stark abweicht — bei letzterer ist die Relation vielleicht ein wenig zuungunsten des Kalkes verschoben — fanden wir bei unseren Fällen gewaltige Abweichungen von der Norm. Unsere Resultate zeigen uns, daß das Verhältnis der genannten anorganischen Bestandteile stark zuungunsten der Phosphorsäure, zum Teil auch der Kohlensäure verändert ist, *während der Kalk — relativ — bisweilen hochgradig vermehrt ist*. Die Menge des Magnesiumoxyds ist normal, während sie bei Rachitis und zum Teil auch bei der Osteomalacie eine Tendenz zur Vermehrung zu haben scheint. Unsere Befunde zeigen weiter, daß von einer konstanten Zusammensetzung nicht die Rede sein kann, die Analysenwerte sind ganz und gar ungleich, und dies gilt nicht nur für verschiedene Individuen, sondern auch für verschiedene Skeletteile ein und derselben Person.

Unsere Untersuchungen legen die Annahme nahe, daß der Organismus bei dieser Form von Osteopathie unter hochgradigem Mangel an Phosphor leidet und nun diesen Bedarf aus der, vielleicht letzten ihm zur Verfügung stehenden Quelle, den Knochen, deckt. Geht der Abbau stürmisch vor sich, so findet sich in den befallenen Knochen ein gewaltiger relativer Calciumüberschuß, wie z. B. im Falle D., Rippen. Hier fand sich auch in vivo, obwohl die Rippen keineswegs auffallend weich waren, eine hochgradige Schmerzhaftigkeit derselben. Bei allmählichem Abbau hingegen gleicht sich das Verhältnis des Calciums zur Phosphorsäure immer wieder gegen die Norm hin aus. Als Beispiel seien die Tibien der analysierten Fälle zitiert, die sämtlich eine untereinander gleiche Zusammensetzung zeigen und nur wenig von der Norm abweichen. Zugunsten dieser Erklärung sprechen die Tatsachen, daß die Tibien niemals so hochgradig von dem Zerstörungsprozeß betroffen werden wie Rippen und Becken. Die Corticalis war niemals so stark verschmälert, sie war niemals weich oder für das Messer schneidbar. Die Tibien waren in keinem Falle — auch bei dem zahlreichen, klinisch beobachteten Material — deformiert, die Schmerzhaftigkeit war niemals eine so vehemente, wie dies speziell bei den Rippen gefunden wurde.

Die geringe prozentuelle Verschiebung der anorganischen Bestandteile in der Tibienasche und die Übereinstimmung dieser in all den vier

sonst doch so verschiedenartigen Fällen kann aber noch dahin gedeutet werden, daß in den Tibien zur Zeit des Todes der Abbauprozess bereits zum Stillstand gekommen war. Dementsprechend war es in den Relationen wieder zum Ausgleich gekommen. Der Unterschied gegenüber der Norm ist nur ein kleiner; er besteht einzig in einer geringen relativen Vermehrung des CaO (1 bis 2 %). Dazu sei bemerkt, daß auch im normalen Knochen nach der Verteilung der Säuren auf die Kalkbasen noch ein kleiner ungesättigter Kalkrest zurückbleibt (etwa 1 %), der nach *Gassmann* (l. c. S., 168) als Grundbedingung für die Möglichkeit eines weiteren Knochenaufbaues aufzufassen ist. Es braucht uns also keineswegs zu wundern, wenn dort, wo ein Abbau von Knochensubstanz stattgefunden hat, ein etwas größerer Rest von „freiem Kalk“ zurückbleibt. Konsequenterweise müssen wir annehmen, daß in Rippen und Becken der untersuchten Fälle bis zum Tode der Abbauprozess mehr minder stürmisch aktiv war.

Für die Weichheit der Knochen ist die chemische Zusammensetzung ihrer Asche nicht von Belang; die festen Tibien enthalten 54 bis 55 % CaO , die ganz weichen Rippen von Fall B. und C. 57 %, bzw. 64 % CaO , die wiederum festeren, beim Brechen deutlich knackenden Rippen des Falles D. 76,5 % CaO . Hier sei auch auf die bisweilen sehr weichen Knochen bei Rachitis und Osteomalacie verwiesen, die stets eine fast normale Aschenzusammensetzung aufweisen. Für die Festigkeit scheint einzig und allein die Menge der anorganischen Substanz in ihrem Verhältnis zur organischen und die absolute Menge der gesamten Knochensubstanz ausschlaggebend zu sein. Wo diese gering ist, dort ist der Knochen weich, biegsam, mit dem Messer schneidbar.

Die auffallend konstante Aschenzusammensetzung des normalen Knochens, die bereits den älteren Biochemikern bekannt gewesen war, hat immer wieder zu Versuchen geführt, die Relation zwischen den anorganischen Knochenbestandteilen in eine starre Formel zu pressen. Während *Hoppe-Seyler*¹⁾ die relativ übersichtliche Komplexformel des Apatits $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3$ als Norm hinstellen wollte, ist *Gabriel*²⁾ zu der höchst undurchsichtigen Relation $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}_5\text{H}_2\text{P}_5\text{O}_{13} + \text{aq.}$ gelangt. Wenn wir es versuchen wollten, ähnliche Berechnungen bei unseren Fällen durchzuführen, so unterliegt dies bei einigem guten Willen gar keinen besonderen Schwierigkeiten. So können wir z. B. für die Asche der Tibien die Formel $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 2\text{CaO}$ berechnen für die Asche der Rippen im Falle A. $2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 3\text{CaO}$, für das Becken desselben Falles $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 3\text{CaO}$, für die Asche der Rippen im Falle D. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 8\text{CaO}$. Aber

1) Phys. Chem. 1881.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 18, 257, 1893.

auch noch andere Formeln lassen sich für dieselben Skeletteile errechnen, so z. B. für die Tibien $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3$. Der Wert derartiger rechnerischer Formulierungen scheint wohl mehr als problematisch zu sein, derartige Formeln besagen ja im Grunde genommen gar nichts anderes, als daß in der Knochenasche Gemenge von Calciumphosphat und Calciumcarbonat vorliegen, wobei die Menge der Phosphor- und der Kohlensäure nicht ausreicht, um das vorhandene Calcium abzusättigen. Die nächstliegende Deutung dieser Konstatering ist wohl die, daß im lebenden Knochen durchaus nicht alles Calcium an Phosphor- und Kohlensäure gebunden war, vielmehr ein nicht unerheblicher Kalkrest sich in organischer Bindung, höchstwahrscheinlich an die Karboxyle der Proteine gekettet vorhanden war. Und dieser Überschuß tritt eben in der Knochenasche als überschüssiges CaO zutage. Man muß sich hier zunächst fragen, sagt Fürth¹⁾, ob denn das Suchen nach einer bestimmten und konstanten Formel überhaupt berechtigt ist und ob man es nicht vielmehr mit einer Niederschlagsbildung zu tun habe, bei der ein inkonstanter und je nach den Bedingungen variierendes Gemenge schwer löslicher Salze sich eben in der organisierten Knochensubstanz niederschlägt. Hofmeister²⁾ ist auf Grund neuerer Versuche zu der Annahme gelangt, daß die Konstanz in der Zusammensetzung der Knochensubstanz nicht durch die Bildung einer bestimmten Verbindung, sondern durch den annähernd konstanten Carbonat- und Phosphorgehalt des Blutplasmas und der Lymphe bedingt ist. Auch Versuche von G. Wells führten zu einer ähnlichen Schlußfolgerung. Aron³⁾ sagt, daß das Ossein ein kolloidaler oder doch den Kolloiden sehr nahe stehender Körper sei und daß dieses die Fähigkeit besitze, anorganische Elemente durch Adsorption zu binden. Diese adsorbierten Mengen stehen nun durchaus nicht immer in einfachen stöchiometrischen Beziehungen zueinander, so daß sie etwa auf eine chemische Formel stimmten; denn es können aus einer Lösung sowohl Elektrolyte als solche wie auch einzelne Ionen in nicht stöchiometrischem Verhältnis adsorbiert werden.

Gasemann (l. c., S. 164) sagt, die Stabilität des gegenseitigen Verhältnisses der Aschenbestandteile bei der Rachitis spreche dafür, daß der Rachitis als Ursache nicht eine allmähliche Knochenzersetzung zu eigen sei. Wäre dies der Fall, so würde eine derartige Konstanz in dieser Vollendung nicht denkbar sein, vielmehr würde die Analyse da und dort Verschiebungen aufweisen, die diese Krankheit als „Auflösungsprodukt“ charakterisieren würde. Dasselbe muß auch für die Osteomalacie gelten.

Die hochgradige Variabilität der Aschenzusammensetzung im Sinne einer relativen Calciumvermehrung bei unseren Osteopathiefällen charak-

¹⁾ Probleme d. physiol. u. path. Chem. 1, 262, 1912.

²⁾ Zitiert nach Tanaka, diese Zeitschr. 35, 113, 1911.

³⁾ Oppenheimer, Handb. d. Biochem. 2 (2), 181, 1909.

terisiert dieselben hinlänglich als einen Krankheitsprozeß, der von Osteomalacie und Rachitis seinem Wesen nach grundverschieden ist, bei welchem die anorganische Knochensubstanz einer regelrechten Zersetzung unterliegt.

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchungen beziehen sich auf die Zusammensetzung der Knochenasche in vier Fällen schwerer *Kriegsosteopathie*, welche durch zum Teil hochgradige Knochenerweichung und Skelettverbildung, insbesondere im Bereiche des Thorax und des Beckens charakterisiert erscheinen.

2. Während unsere Aschenanalysen normaler Knochensubstanz durchaus mit den Analysenwerten anderer Untersucher übereinstimmen ($\text{CaO} = 51,80$ bis $52,10\%$, $\text{MgO} = 0,78$ bis $0,85\%$, $\text{P}_2\text{O}_5 = 38,70$ bis $38,90\%$, Rest = $8,55$ bis $8,66\%$), ergaben sich bei Untersuchung der Rippen und der Beckenknochen Osteopathischer Werte von $\text{CaO} = 56,8$ bis $76,8\%$, $\text{MgO} = 0,74$ bis $0,80\%$, $\text{P}_2\text{O}_5 = 16,2$ bis $37,3\%$, Rest = $4,04$ bis $8,59\%$. Geringer waren die Abweichungen von der Norm und untereinander bei den Tibien in welchen der Prozeß anscheinend langsamer vor sich gegangen und bereits im Abklingen begriffen war: $\text{CaO} = 54,5$ bis $54,8\%$, $\text{MgO} = 0,77$ bis $0,81\%$, $\text{P}_2\text{O}_5 = 36,1$ bis $36,8\%$, Rest = $7,61$ bis $8,59\%$.

3. Wir sehen also bei den schwer osteopathisch erkrankten Knochen eine weit außerhalb der Fehlergrenzen der Analysen liegende *relative Zunahme von CaO mit einer starken relativen Abnahme von P₂O₅* kombiniert. Der *Gehalt an MgO ist konstant* und erscheint der Norm gegenüber kaum verändert.

4. Die Versuche, die Zusammensetzung der Knochenasche in eine starre chemische *Formel* pressen zu wollen, erscheinen von vornherein ihrem Wesen nach verfehlt. Offenbar handelt es sich beim Verkalkungsvorgange um Niederschlagsbildungen schwer löslicher Erdalkalisalze, wobei die Menge des in Knochen vorhandenen Calciums größer ist als dem Absättigungsvermögen der vorhandenen Phosphor- und Kohlensäure entspricht; vermutlich ist dieser Kalküberschuß im lebenden Knochen in organischer (Eiweiß-) Bindung vorhanden. Bei der Osteopathie ist dieser *Kalküberschuß* allem Anschein nach infolge einer *primären Abnahme der Phosphorsäure* abnorm groß.

5. Während bei der *Rachitis* und *Osteomalacie* die Relation der Aschenbestandteile der Norm gegenüber nicht sehr wesentlich verschoben ist, erscheint die *Kriegsosteopathie* durch die weitgehende prozentuelle Verschiebung der Aschenbestandteile im Sinne einer Kalkanreicherung der Osteomalacie und Rachitis gegenüber als ein *grundverschiedener Prozeß* charakterisiert.

Über die Bildung der rechtsdrehenden β -Furyl- α -milchsäure durch Proteusbakterien.

Von

Takaaki Sasaki und Ichiro Otsuka.

(Aus dem Sasaki-Laboratorium im Kyoundo-Hospital zu Tokio.)

(Eingegangen am 13. November 1922.)

β -Furyl- α -alanin oder irgend eine Aminosäure mit einem Furan-kern ist noch niemals als ein Naturprodukt gefunden. Die nahe Beziehung des Furfurols zu den Kohlenhydraten würde für ein solches Vorkommen sprechen, wenn man die Empfindlichkeit des Furankerns gegen starke Säure und überhaupt das verhältnismäßig labile Verhalten des Furylalanins und somit die große Schwierigkeit einer unversehrten Abspaltung und Isolierung aus Aminosäureketten bzw. Gemischen berücksichtigt. Andererseits spricht die Giftigkeit dieser Aminosäure gegenüber dem Kaninchenorganismus gegen eine solche Vermutung, besonders ist das Vorkommen in Nahrungseiweißstoffen recht unwahrscheinlich.

Trotzdem ist das Studium des bakteriellen Abbaus von Furylalanin nicht ohne Interesse, einerseits um die Kenntnis der α -Hydroxysäuren zu erweitern, andererseits um gegebenenfalls Furyläthylamin, welches nach *Windaus* und *Dalmer* eine pharmakodynamisch interessante Substanz zu sein scheint, nach der Analogie proteinogener Amine biologisch darzustellen. Besonders ist die Gewinnung von α -Hydroxysäure aus Furylalanin mittels der üblichen rein chemischen Methode kaum zu erhoffen; denn der Furankern ist auch gegen salpetrige Säure recht empfindlich. Gerade dazu ist die Bakterienmethode sehr geeignet, zumal sie eine optisch aktive Form zu gewinnen gestattet. In der Tat konnten wir mittels der von uns geübten Methode die rechtsdrehende Furylmilchsäure aus dl-Furylalanin durch Proteusbakterien darstellen, wenn auch in einer geringen Ausbeute. Die β -Furyl- α -milchsäure ist sowohl in racemischer als auch in aktiver Form unseres Wissens noch nicht bekannt. Die von uns bereitete rechtsdrehende Säure ist nicht ganz beständig, bräunt sich von selbst beim Aufbewahren oder beim Erwärmen, indem ein Teil davon in Wasser unlöslich wird.

Mittels Subtilisbakterien einen der optischen Antipoden der Substanz zu gewinnen, gelang uns leider trotz vielfacher Versuche nicht. Das Furyläthylamin konnten wir bisher nicht in die Hand bekommen.

Experimenteller Teil.

Die zum Versuch verwendeten Proteusbakterien waren von demselben Stamm, wie in der früheren Mitteilung¹⁾. Die Versuchsanordnung war auch ganz gleich. Vier Kolben mit je 2 g dl-Furylalanin wurden aufgearbeitet. Nach der 25tägigen Verweildauer im Brutschrank wurde das ganze Gemisch unter vermindertem Druck abgedampft. Die wässrige Lösung des Rückstandes wurde mit Phosphorsäure stark angesäuert, unter Zusatz von wenig Tierkohle geschüttelt und filtriert. Das Filtrat wurde sodann mittels des *Kumagawa-Sutoschen* Extraktors mit Äther extrahiert. Nach Abdampfen des Ätherextrakts blieb ein rotbrauner Sirup zurück, welcher beim Stehen im Eisschrank nach einigen Tagen ganz kristallinisch wurde. Die Kristalle wurden auf einer Tonplatte gereinigt und in Äther gelöst, sodann nach starkem Abkühlen in einer Kältemischung mit Petroläther gefällt. Die Ausbeute der zarten Kristallnadeln betrug 1,0 g. Sie schmolzen bei 95 bis 96° C. Durch Umfällung veränderte sich der Schmelzpunkt nicht mehr. Die noch einmal umgefällte Substanz wurde über Phosphorsäureanhydrid bei Zimmertemperatur in vacuo getrocknet:

0,1625 g Substanz	0,3200 CO ₂	0,0745 H ₂ O
C ₇ H ₈ O ₄	Berechnet	Gefunden
C	53,82	53,71
H	5,17	5,13

14,7772 g wässrige Lösung, welche 0,2314 g Substanz, mithin 1,5646 %, enthielt und das spez. Gew. 1,0043 hatte, drehte im Ein-Dezimeterrohr bei 18° Natriumlicht 0,43 nach rechts.

$$[\alpha]_D^{18} = + 27,36^\circ.$$

¹⁾ Diese Zeitschrift 121, 167, 1921.

Über die Verwendbarkeit des Zuntz-Geppert-Apparates bei Respirationsversuchen mit kleinen Tieren.

Von

Fr. W. Krzywanek.

(Aus dem tierphysiologischen Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule
zu Berlin.)

(Eingegangen am 15. November 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der pekuniären Notlage, in der sich heute mehr oder weniger unsere wissenschaftlichen Institute befinden, gewinnt das kleine Tier als Objekt für Respirationsversuche dauernd an Interesse. Wenn auch in vielen Fällen das große Versuchstier nicht entbehrt werden kann, kann doch das Arbeiten mit kleinen Tieren oft sehr gut verwendbare Resultate liefern; besonders bei denjenigen Fragestellungen, deren Bearbeitung auf einem reichhaltigen Versuchsmaterial fußen muß, scheiden unsere großen Haustiere als Versuchsobjekte der ungeheuer gestiegenen Kosten wegen ohne weiteres aus. Zu Studien des Vitaminproblems und des anaphylaktischen Schokes z. B. sind kleine Versuchstiere (Ratten, Mäuse, Meerschweinchen und Vögel) geradezu unentbehrlich.

Aus diesen Gründen ist natürlich der Wunsch nach einem einfachen, billigen und zuverlässige Werte liefernden Respirationsapparat für kleine Tiere ein allgemeiner; diesem Wunsche Rechnung tragend sind eine Anzahl Apparate konstruiert worden, die den angegebenen Bedingungen in zweckentsprechender Weise mehr oder weniger genügen. Diese lassen sich alle auf die beiden Haupttypen zurückführen, die Apparate von *Pettenkofer* und *Reignault-Reiset*, zu denen als dritter Typ die Methode von *Zuntz-Geppert* tritt, die meines Wissens in dieser Weise noch nicht angewandt wird.

Auf dem Prinzip von *Pettenkofer* beruht der Apparat, den *Haldane*¹⁾ konstruiert hat und der auch eine Bestimmung des O₂-Verbrauchs auf indirektem Wege gestattet. Von den beiden Komponenten des Stoffwechsels, der CO₂ und des O₂, ist der letztere bekanntermaßen der wichtigere Faktor und ein Apparat um so besser, je genauer er die Messung des O₂-Ver-

¹⁾ Journ. of Physiol. 13, 419, 1892.

brauchs gestattet. Schon *Pettenkofer* und *Voit*¹⁾ hatten versucht, mit ihrem Apparat den O_2 -Verbrauch des Tieres zu bestimmen; ihrer Berechnung lag die Tatsache zugrunde, daß die Gewichts-differenz des Tieres während des Versuchs bedingt wird durch die Differenzen seiner Einnahmen und Ausgaben während derselben Zeit. Da aber die Bestimmung der einen Ausgabe, nämlich des Wasserdampfes, nur unvollkommen gelang, wiesen die gefundenen Zahlen für den O_2 -Verbrauch zum Teil erhebliche Fehler auf. Von den Versuchen, diese Fehlerquelle zu eliminieren, dürfte die von *Haldane* gefundene Lösung die glücklichste sein. Er vermied die Unzuträglichkeiten dadurch, daß er zu Beginn und am Schluß des Versuchs *das Tier mit dem Respirationskasten* wog, wodurch seine Methode allerdings auf die Verwendung kleiner Tiere beschränkt blieb, deren Wägung noch hinreichend genau vorgenommen werden konnte. Den Beweis der Genauigkeit dieser Methode hat *Haldane* selbst durch Kontrollversuche, vor allem aber die Arbeiten des *Asherschen* Instituts erbracht, die auch eine Reihe unwesentlicher Änderungen an der Apparatur vornahmen. Während *Haldane* selbst mit Kaninchen und Meerschweinchen arbeitete, konnte *Danoff*²⁾ nachweisen, daß die Genauigkeit der Methode auch bei Verwendung kleinerer Tiere (weißer Ratten) eine hinreichende war. *Hauri*³⁾, der Kaninchen als Versuchstiere benutzte, bei denen er mangels einer genügend genauen Wage nur CO_2 - und Wasserabgabe bestimmen konnte, stellte Kontrollversuche an, um den Fehler der Wasserbestimmung zu ermitteln. Ebenfalls mit Kaninchen arbeiteten *Ruchti*⁴⁾ und *Bertschi*⁵⁾; der letztere richtete den Respirationskasten für eine künstliche Erwärmung ein, so daß er bei Temperaturen von 23, 27 und 33° Versuche anstellen konnte. *Abelin*⁶⁾ benutzte die *Haldane*-Apparatur ebenfalls zur Bestimmung des Gaswechsels weißer Ratten, und *Loening*⁷⁾ studierte am Meerschweinchen mit derselben Methode den Gaswechsel im anaphylaktischen Schock.

Auf dem Prinzip von *Reignault-Reiset* beruht ein sehr sinnreicher, von *Cohnheim*⁸⁾ angegebener Apparat, der eine direkte Bestimmung eines selbst sehr kleinen O_2 -Verbrauchs ermöglicht. Aus diesem Grunde eignet sich der Apparat besonders für Untersuchungen an sehr kleinen Tieren (Fröschen, Regenwürmern u. dgl.), wie sie *Joel*⁹⁾ mit ihm vorgenommen hat. Aber auch für weiße Mäuse ist der Apparat gut verwendbar, wie die Untersuchungen *Groebbels*¹⁰⁾ lehren, die dieser zum Zwecke der Betrachtung der Wirkung vitaminfreier Nahrung auf den Gaswechsel anstellte.

Gewissermaßen durch eine Kombination des *Reignault-Reiset*- und *Pettenkofer*-Prinzips erreichte *Fridericia*¹¹⁾ eine doppelte Bestimmung des O_2 -Verbrauchs und damit eine sichere Kontrolle des letzteren. Sein Apparat ist nach der Methode von *Haldane* gebaut, die Ventilationsluft wird aber

1) Liebigs Ann. 1862/63, II. Suppl.-Band, S. 1.

2) Diese Zeitschr. 93, 44, 1919.

3) Ebendaselbst 98, 1, 1919.

4) Ebendaselbst 105, 1, 1920.

5) Ebendaselbst 106, 37, 1920.

6) Ebendaselbst 101, 197, 1920.

7) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 66, 84, 1911.

8) Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 1910.

9) Ebendaselbst 107, 231, 1919.

10) Ebendaselbst 122, 104, 1922.

11) Diese Zeitschr. 54, 92, 1913.

nicht durch das offene System gesaugt, sondern das System ist geschlossen, und die Luft in ihm wird durch eine Pumpe in Zirkulation versetzt. Die O_2 -Bestimmung geht einmal nach *Haldane* durch Wägung vor sich, durch das geschlossene System ist aber ferner die Anbringung eines Spirometers möglich, das mit O_2 gefüllt ist und aus dem sich der verbrauchte O_2 selbsttätig ersetzt. Die Differenz des Spirometerstandes zu Beginn und zum Schluß des Versuchs ergibt also die zweite direkte O_2 -Bestimmung.

Die Möglichkeit einer derartigen Doppelbestimmung ist natürlich von außerordentlichem Vorteil, und es ist von jeher erstrebt worden, eine solche Kontrolle zu schaffen. Da das bei den älteren und größeren Apparaten nicht möglich war, half man sich damit, sie in besonderen Kontrollversuchen (Verbrennen von Alkohol, Äther, Stearinkerzen u. ä.) zu erproben. Eine Garantie, daß der Apparat nun bei den Tierversuchen ebenso funktionierte wie bei den Kontrollversuchen, war natürlich nie gegeben. Bei den Respirationskalorimetern (*Rubner*, *Atwater* und *Rosa Benedikt*, und *Milner* u. a.) war zwar eine solche Kontrolle durch Bestimmen des Energieumsatzes auf direktem und indirektem Wege vorhanden, bei den kleinen Respirationsapparaten ist sie aber nur mit der Methode von *Fridericia* möglich. Es soll nicht unterlassen werden darauf hinzuweisen, daß bei der Kleinheit der Respirationsapparate im allgemeinen Kontrollversuche mit Alkohol usw. sehr schwierig, wenn nicht unmöglich sind, wodurch die Möglichkeit einer Doppelbestimmung noch an Bedeutung gewinnt. Man kann sich ohne eine solche auch so helfen, wie es *Danoff* (l.c.) getan hat, der seine Ratten z. B. mit Zucker fütterte und in dem gefundenen Respirationsquotienten einen Maßstab für die Genauigkeit der Methode erblickte.

Aus dem oben Gesagten geht hervor, daß in der Literatur eine Anzahl Apparate beschrieben sind, die in zahlreichen Versuchen ihre Brauchbarkeit erwiesen haben. Wenn ich es dennoch unternehme, einen weiteren Apparat mitzuteilen, mit dem ich sehr gute Ergebnisse erzielt habe, so liegt das daran, daß meiner Meinung nach das Arbeiten mit den oben beschriebenen ziemlich *zeitraubend* ist und sich die Versuche über *längere Zeit* erstrecken müssen. So erfordert ein Versuch nach der Methode von *Haldane* z. B. zweimal 4 Wägungen von größter Genauigkeit. Je kürzer die Versuche angestellt werden, um so größer sind natürlich die Fehlerquellen. Andererseits benötigt die Methode von *Fridericia* eine Rotationspumpe und ein Spirometer, zwei Apparate, deren Anschaffungskosten heute sehr beträchtlich sind. Da der Spirometerstand außerdem nur bis zu einer Genauigkeit von 2,56 cm ablesbar ist, werden die Fehler bei sehr kurzen Versuche ebenfalls erheblicher. Als kürzesten Versuch führt *Fridericia* einen von $2\frac{1}{2}$ Stunden an, bei dem die Werte für die beiden Bestimmungen nur um 0,6% auseinander liegen, die Übereinstimmung also noch eine sehr gute ist.

Aus diesen Gründen benutze ich einen Apparat, der 1. in gasanalytischen Laboratorien keinerlei Anschaffungen erfordert, 2. Versuche von $\frac{1}{4}$ Stunde bis zu beliebig langer Zeit gestattet, 3. bei sorgfältigem Arbeiten Fehler von höchstens 1% bedingt, 4. eine doppelte Bestimmung der CO_2 -Abgabe erlaubt und 5. sehr wenig Zeit und Bedienung in Anspruch nimmt.

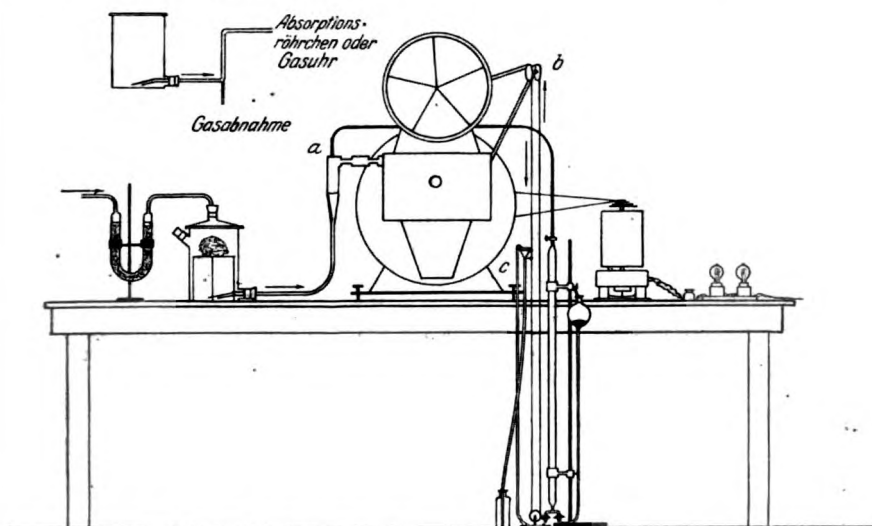


Abb. 1. a Abnahmestelle des Teilstroms, b endlose Schnur, an der die Auslaufspitze mit Trichterchen c befestigt ist. Oben links Anordnung der Teilstromabnahme bei Verwendung einer trockenen Gasuhr oder der doppelten CO_2 -Bestimmung.

Der Apparat (s. Abb. 1) ist im Prinzip ein „passiv funktionierender“ Zuntz-Geppert-Apparat. Während beim Zuntz-Geppert-Apparat die Versuchsperson durch ein Mundstück atmet und so aktiv die Gasuhr bewegt, wodurch in der bekannten Weise selbsttätig die Absaugung der Analysenluft einsetzt, habe ich die Versuchsperson durch einen kleinen Tierbehälter ersetzt und die Gasuhr von außen in Umdrehung versetzt. Auf diese einfache Weise erhält man einen Apparat, der wie ein Pettenkofer-Apparat arbeitet, oder, da die Durchschnittsprobe auf CO_2 und O_2 analysiert wird, wie der von Jaquet¹⁾ zuerst beschriebene. Von diesem Apparat schreibt Johannsen im Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden 3, 1152, 1910²⁾: „Es wird bei der Berechnung vorausgesetzt, daß die Zusammensetzung der Luft in der Respirationsskammer während der betreffenden Versuchsperiode keine Veränderung

¹⁾ Verh. d. naturforsch. Ges. in Basel 15, 252, 1903.

²⁾ Siehe auch an dieser Stelle die Berechnung des O_2 aus dem Defizit der ventilierten Luft.

erleidet oder jedenfalls, daß die Schwankungen derselben belanglos sind. Um dies zu erreichen, nimmt man das *Volumen der Respirationskammer möglichst klein* und ordnet die Versuche so an, daß die *Kohlensäureproduktion des Versuchsindividuum während der Versuchsperiode sich möglichst unverändert hält*. . . . Unter solchen Verhältnissen tritt bald ein *stationärer Zustand* in der Respirationskammer ein, und wenn möglich, wartet man diesen Zeitpunkt für den Anfang der eigentlichen Versuchsperiode ab. Bei Versuchsperioden längerer Dauer treten die in der Respirationskammer enthaltenen Gasmengen neben den ausventilierten in den Hintergrund und die Schwankungen der ersteren können ganz vernachlässigt werden“.

Diese Bedingungen lassen sich nun in sehr einfacher Weise verwirklichen. Die Größe der Respirationskammer kann je nach der verwendeten Tierart beliebig klein gewählt werden; Ratte und Hamster, die mir als Versuchstiere dienten, pflegten sich bald nach dem Einbringen in den Apparat zusammenzurollen und in dieser Stellung während des ganzen Versuchs zu verweilen. Der von *Johannsen* erwähnte stationäre Zustand tritt, wie ich mich in mehreren Versuchen überzeugte, schon etwa 10 Minuten nach Beginn des Versuchs ein. Um diese Frage zu untersuchen, habe ich in mehreren Fällen nach Ingangsetzen der Gasuhr von 10 zu 10 Minuten eine Luftprobe entnommen, die ich auf CO_2 analysierte. Bei gleichmäßiger Ventilation war in jedem Falle die Zusammensetzung schon von der ersten Probe, 10 Minuten nach Beginn des Versuchs, konstant und entsprach vollkommen der in dem anschließenden mehrstündigen Versuch gewonnenen. In Tabelle I ist ein derartiger Versuch angeführt.

Tabelle I.
Versuch 2 am Hamster.
Beginn 12^h 40'.

Zeit der Probeentnahme	% CO_2 -Gehalt der Teilstromprobe
12 ^h 50'	0,358
1 00	0,356
1 10	0,358
1 ^h 20' bis 3 ^h 20'	0,359

Als Tierbehälter für die Ratte und den Hamster hat sich eine *Brühlsche* Vorlage von etwa 1½ Liter Fassungsvermögen sehr gut bewährt. Nach zahlreichen Versuchen lieferte die in der Figur gezeichnete Anordnung die besten Ergebnisse. Die Zufuhr der Außenluft, die ein mit Natronkalk beschicktes Rohr passieren mußte, *wodurch sich die Analyse derselben erübrigte*, erfolgte durch die obere Öffnung im Deckel, die Absaugung der verbrauchten Luft durch den unteren Ansatz-

stutzen, durch den ein Rohr bis in die Mitte der Vorlage geführt war, das sich nach unten zu öffnete. Durch den Verschlußstopfen des oberen Ansatzstutzens war ein Thermometer geführt (in der Abbildung nicht gezeichnet), das eine Ablesung der Temperatur im Apparat gestattete. Das Tier selbst befand sich nicht auf dem Boden des Gefäßes, sondern auf einem Drahtnetz, das auf drei angelöteten Füßchen stand, etwa im oberen Drittel desselben. Auf diese Weise wurde erreicht, daß die Durchmischung der Luft im Apparate eine vollständige war, wie die Konstanz zahlreicher Kontrollanalysen der abgesogenen Luft ergab.

Die Ventilation des Respirationsapparats geschah durch eine *Zuntz-Geppert-Wassergasuhr*, die auf verschiedene Weise in möglichst gleichmäßige Umdrehungen versetzt werden konnte. Da unser Institut im Besitze eines durch einen Nebenschlußmotor betriebenen Kymographions ist, habe ich dieses durch Aufsetzen einer Schnurlaufscheibe auf die Achse als Antrieb für die Gasuhr benutzt. Durch einfaches Umstellen eines Hebels kann man die Umdrehungsgeschwindigkeit der Trommel auf $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{50}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{5}$, 1, 5, 10, 50 und 100 pro Minute regulieren, wodurch man in Verbindung mit Schnurlaufscheiben von verschiedenem Durchmesser an Gasuhr und Motor wohl jede gewünschte Ventilationsgröße einstellen kann. Ist man nicht im Besitze eines Motors mit sehr geringer Umdrehungsgeschwindigkeit, so kann man auch mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe ventilieren, wie es z. B. *Haldane* bei seinem Apparat getan hat. Es ist dann aber unbedingt nötig, eine große Flasche als Druckausgleicher zwischen Gasuhr und Pumpe einzuschalten, da die Pumpen nie so gleichmäßig ziehen wie z. B. ein Nebenschlußmotor. Noch auf eine dritte Art kann man die Gasuhr in eine sehr gleichmäßige langsame Bewegung versetzen, nämlich durch eine gewöhnliche Pendeluhr. Zu diesem Zwecke hängt man eine Pendeluhr so über der Gasuhr auf, daß die Kette, die nicht das Gewicht trägt, auf die Achse der Gasuhr aufgewickelt werden kann. Der Widerstand, den die Gasuhr der Umdrehung entgegensetzt, muß durch Vergrößern des Gewichts am anderen Ende der Kette kompensiert werden. Durch Verkürzen eventuell ganzes Abnehmen des Pendels und Anhängen leichter bzw. schwerer Gewichte kann dann eine sehr weitgehende Regulierung der Ventilation erfolgen. Man darf nur die Umwicklungsstelle an der Achse der Gasuhr nicht zu dick wählen, eventuell muß zu diesem Zwecke ein dünner Stift besonders angelötet werden. Auf diese Weise kann man durch das Ablaufen der Kette den gleichmäßigsten Gang der Gasuhr erreichen.

Wie gleichmäßig auch der Motor arbeitet, ersieht man aus der Tabelle II, die einige Ablesungen der Gasuhr von 10 zu 10 Minuten während des Versuchs 4 zeigt. Die Werte der Tabelle II sind nicht

Tabelle II.
Versuch 4 am Hamster.

Zeit	Gasuhr Liter	Differenz Liter
10 ^h 48'	251,00	—
10 58	257,90	6,90
11 08	264,80	6,90
11 18	271,67	6,87
11 28	—	—
11 38	—	—
11 48	—	—
11 58	299,27	27,60 : 4 = 6,90
12 08	306,15	6,88
12 18	—	—
12 28	319,95	13,80 : 2 = 6,90
12 38	226,84	6,89
12 48	333,75	6,91

reduziert, die durchschnittliche Minutenventilation des 2½stündigen Versuchs 4 betrug unreduziert 690,20 ccm, reduziert 628,60 ccm.

Die Probeentnahme erfolgte über Quecksilber durch die Abnahme-stelle der Gasuhr (a) in der beim *Zuntz-Geppert*-Apparat üblichen Weise, die auch aus der Abbildung zu ersehen ist. Es wurde diese Anordnung gewählt, da bei dem geringen CO₂-Gehalt von durchschnittlich 0,5 % der ventilierten Luft die Probeentnahme über Quecksilber zuverlässigere Werte liefert. Zur Analyse der Probe stand ein *Haldane*-Apparat zur Verfügung, der 50 ccm faßte und wegen seiner genauen Eichung sehr zuverlässige Resultate lieferte. Die Doppelanalysen lagen gewöhnlich nicht mehr als 1 % des CO₂-Wertes auseinander, d. h. bei einem CO₂-Gehalt von 0,5 %, z. B. durften sich die gefundenen Werte nur um 0,005 % unterscheiden. Die größtmögliche Genauigkeit des *Zuntz-Geppert-Analysenapparats* beträgt 0,01 %, also die Hälfte des *Haldane*-Apparats. Wenn man den Gasanalysenapparat von *Zuntz-Geppert* zur Analyse verwenden will, muß man nur dafür sorgen, daß die Ventilation so langsam vor sich geht, daß der Prozentgehalt an CO₂ in der Tierkammer und damit der Luftprobe auf 1 % steigt, was man durch Probieren ohne Schwierigkeit erreichen kann. Dann beträgt der Analysenfehler ebenfalls nicht mehr wie 1 %, es wird also dieselbe Genauigkeit erreicht wie mit dem *Haldane*-Apparat.

Hat man keine feuchte Gasuhr zur Verfügung, so kann man auch die von *Zuntz*¹⁾ angegebene transportable Vorrichtung mit einer trockenen Gasuhr benutzen. Diese wird man am besten mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, oder, indem man sie entsprechend auf eine Seite legt, daß die Achse wagerecht liegt, durch die Pendeluhr, wie oben angegeben, betreiben. Im Gegensatz zu der Wassergasuhr passiert bei

¹⁾ Höhenklima und Bergwanderungen. Berlin 1906.

der trockenen die Luft vor dem Eintritt in dieselbe eine Mischtrommel, aus der heraus die Probe entnommen wird. In vielen Versuchen hat sich herausgestellt; daß bei dem langsamen und gleichmäßigen Luftstrom *die Durchmischung der Luft in der Trommel eine ungenügende ist.* Da die Luft nur durch die Mitte streicht, an den Wandungen aber stagniert, erhält man bei der Probeentnahme durch den vorhandenen Ansatzstutzen leicht falsche Werte. Dies läßt sich mit Sicherheit dadurch vermeiden, daß man bei Verwendung einer trockenen Gasuhr die Probe dicht hinter dem Respirationskasten entnimmt (Abb. 1. Nebengigur). Zu diesem Zwecke genügt es, ein Glasröhrchen, das mit einem kleinen Ansatzstutzen versehen ist, vor der Gasuhr einzuschalten. Das Glasrohr ist zweckmäßig rechtwinklig gebogen und der Ansatzstutzen in dem rechten Winkel angebracht. Dadurch erreicht man, daß *an dieser Stelle ein Luftwirbel entsteht*, der eine gute Durchmischung der vorbeistreichenden Luft gewährleistet. Bei der Wassergasuhr ist diese Abknickung, wie aus der Abbildung (a) zu ersehen, von vornherein vorhanden.

Wie schon oben erwähnt, kontrollierte *Fridericia* bei seinem Apparat die O_2 -Bestimmung, indem er den O_2 -Verbrauch auf zwei Wegen ermittelte. Da eine Kontrolle des O_2 -Verbrauchs bei der vorliegenden Apparatur nicht möglich ist, wurde in einigen Fällen die CO_2 -Abgabe auf doppelte Weise bestimmt, nämlich durch die Gasanalyse des Teilstroms und die Absorption im Hauptstrom. Zu diesem Zwecke wurde zwischen Tierbehälter und Gasuhr ein Chlorcalciumröhrchen zur Wasser- und ein Natronkalkröhrchen zur CO_2 -Absorption eingeschaltet, das in seinem letzten Viertel mit Chlorcalcium zur Bindung des vom Natronkalk abgegebenen Wassers gefüllt war. Da vor Beginn des eigentlichen Versuchs eine Zeitlang ventiliert werden mußte, wurde um die Absorptionsröhrchen ein Umgehungsschlauch gelegt, so daß durch Betätigen entsprechender Klemmen der Luftstrom durch die Gefäße oder um dieselben geleitet werden konnte. Durch Wiegen des Natronkalkrohres vor Beginn und nach Beendigung des Versuchs wurde das Gewicht der während der Versuchszeit produzierten CO_2 gefunden. Das Gewicht des gefüllten Rohres wurde so gewählt, daß es noch auf einer chemischen Wage bis auf 0,2 mg Genauigkeit gewogen werden konnte. Das Volumen der absorbierten CO_2 mußte natürlich zu dem an der Gasuhr abgelesenen Volumen addiert werden, ebenso wie in jedem Falle das Volumen der Probe, um eine Rechnung mit den durch die Gasanalyse gefundenen Werten zu gestatten. Es erübrigt sich, zu erwähnen, daß in diesen Fällen die Gasabnahme vor den Absorptionsröhrchen in der oben bei der trockenen Gasuhr angegebenen Weise erfolgen muß.

Der Gang eines Versuchs ist folgender: Das Versuchstier wird auf 1 g genau gewogen und in den Tierbehälter verbracht. Will man die

CO₂-Abgabe doppelt bestimmen, so wird auch das Natronkalkröhrchen gewogen und die Verbindungen hergestellt (die Hähne des Chlorcalcium- und Natronkalkrohres bleiben geschlossen). Dann wird die Gasuhr in Bewegung gesetzt und der Deckel des Respirationskastens nach eventuell erneutem Einfetten aufgesetzt. Bevor man nun den eigentlichen Versuch beginnt, läßt man die Gasuhr einige Zeit laufen, mindestens 10 Minuten. Während dieser Zeit wird das Meßrohr angeschaltet und mehrmals gespült. Soll der Versuch beginnen, so beachtet man mit der Stoppuhr den Zeiger der Gasuhr, und stoppt, sobald die Gasuhr eine ganze Literzahl anzeigt; die Zahl merkt man sich und klemmt sofort den Umgehungsschlauch um die Absorptionsgefäße mit einer Springklemme ab, während man die Hähne der letzteren öffnet. Um dies schneller vornehmen zu können, ist es empfehlenswert, dieselben bis auf den ersten schon vorher zu öffnen, so daß man in dem Augenblick nur einen umzudrehen hat. Dann trägt man die absolute Zeit des Versuchsbeginns, die man nach dem Stand der Stoppuhr zurückrechnen kann, in das Protokoll ein, ebenso den Stand der Gasuhr und den der Thermometer im Tierbehälter und in der Gasuhr. Nachdem nun noch der Hahn zum Meßrohr geöffnet worden ist und man sich überzeugt hat, daß das Quecksilber gut ausläuft und im ganzen System nicht etwa eine Verstopfung eingetreten ist, die man sofort aus dem Stehenbleiben der Gasuhr erkennt, läuft der Versuch ohne weitere Bedienung bis zur Füllung des Meßrohres mit Gas ab. Durch Auflegen der endlosen Schnur der Entnahmeeinrichtung auf verschieden große Schnurlaufscheiben der Gasuhrachse kann man die Gasentnahme beliebig lange, bis zu 24 Stunden, ausdehnen. Im letzteren Fall verwendet man dann besser größere Gassammelrohre, um das Verhältnis zwischen Haupt- und Teilstrom nicht zu weit zu spannen. Soll der Versuch beendet werden, stellt man in dem Augenblick, in dem die Stoppuhr die ganze Minute zeigt, den Motor usw. ab und liest Gasuhr, Thermometer usw. ab. Dann werden die Hähne des Meßrohres und der Röhrchen geschlossen, die letzteren gewogen und die Probe analysiert.

Tabelle III.

Bestimmung des Grundumsatzes bei einem Hamster.

Nr.	Dauer Min.	Vent. pro Min. ccm	CO ₂ -Gehalt des Teil- stroms %	O ₂ -Defizit im Teil- strom %	Pro Minute ccm		RQ.	Gew. g	g-cal. pro Min.		Be- merkungen
					CO ₂	O ₂			absolut	pro kg	
1	180	595,83	0,435	0,628	2,593	3,742	0,69	136	17,41	128,05	In allen Vers. auch an Schließ- das Tier
2	120	962,43	0,359	0,490	2,740	3,736	0,73	136	17,57	129,17	
3	90	1350,40	0,221	0,302	2,988	4,078	0,73	152	19,18	126,16	
4	150	628,60	0,430	0,592	2,702	3,722	0,73	134	17,50	130,50	
5	30	574,90	0,413	0,600	2 374	3,449	0,69	125	16,05	128,42	

Am Hamster, der sich als Versuchstier sehr gut eignet, da er als Nachttier am Tage auch im Respirationskasten zu schlafen pflegt, bestimmte ich in den 5 Versuchen der Tabelle III den Grundumsatz. Die erhaltenen Werte für den Respirationsquotienten und die Übereinstimmung der aus dem O_2 -Verbrauch errechneten Kalorienproduktion pro Kilogramm an den verschiedenen Tagen ist ein Beweis für die Genauigkeit der Methode.

Als noch kleineres Versuchstier benutzte ich eine weiße Ratte, bei der ich zunächst ebenfalls den Grundumsatz feststellte. Die hierher gehörenden Versuche sind in der Tabelle IV zusammengestellt. Auch dieses Tier verhielt sich wie der Hamster in allen Versuchen unbeweglich im Schlaf. Die Übereinstimmung der gefundenen Werte ist eine ähnlich gute wie beim Hamster.

Tabelle IV.

Bestimmung des Grundumsatzes bei einer Ratte.

Nr.	Dauer Min.	Vent. pro Min. ccm	CO_2 -Gehalt des Teils stroms %	O_2 -Defizit im Teil- strom %	Pro Minute ccm		RQ.	Gew. g	g-cal. pro Min.	
					CO_2	O_2			absolut	pro kg
6	60	651,20	0,395	0,587	2,570	3,823	0,67	110	17,79	161,74
7	180	571,95	0,404	0,593	2,311	3,392	0,68	96	15,79	164,43
8	135	588,60	0,417	0,583	2,453	3,431	0,72	97	15,99	164,83
9	40	583,00	0,438	0,610	2,552	3,556	0,72	102	16,72	163,93

Das Verhalten des respiratorischen Gaswechsels in verschiedenen Stadien der Eiweißverdauung zeigen die Versuche der Tabelle V. Da das verabreichte Fleisch sehr fettreich war und das Fett anscheinend zuerst angegriffen wurde, ist in den Versuchen kurz nach dem Fressen eine Änderung des Respirationsquotienten noch nicht vorhanden, der erst einige Stunden später auf 0,80 steigt. Aber auch schon in den ersten Versuchen ist die vermehrte Kalorienproduktion deutlich.

Tabelle V.

Nr.	Dauer Min.	Vent. pro Min. ccm	CO_2 -Gehalt des Teils stroms %	O_2 -Defizit im Teil- strom %	Pro Minute ccm		RQ.	Gew. g	g-cal. pro Min.		Stunden n. d. Nahrungs- aufnahme
					CO_2	O_2			absolut	pro kg	
10	60	644,45	0,565	0,789	3,640	5,085	0,72	110	23,85	216,79	$\frac{1}{2}$
11	45	584,30	0,504	0,695	2,943	4,060	0,72	100	19,09	190,94	$\frac{1}{2}$
12	15	1020,70	0,278	0,377	2,842	3,848	0,74	102	18,19	178,33	1
13	61	622,00	0,504	0,688	3,133	4,279	0,73	98	20,18	205,87	1
14	66	618,10	0,455	0,614	2,814	3,795	0,74	98	17,94	183,05	$1\frac{1}{2}$
15	44	591,30	0,539	0,731	3,186	4,322	0,74	96	20,43	212,83	2
16	44	590,80	0,526	0,677	3,107	4,000	0,80	100	19,20	192,03	3
17	45	531,40	0,664	0,828	3,527	4,400	0,80	101	21,13	209,16	$3\frac{1}{2}$

In der Tabelle VI sind Versuche wiedergegeben, bei denen die Ratte vorher nur Kohlenhydrate erhalten hatte; sie bekam vor dem Versuch entweder Zucker, Brot oder Reis. Trotz verschieden langer Versuchsdauer wurde in jedem Falle ein Respirationsquotient gefunden, der der Einheit sehr nahe lag.

Tabelle VI.

Nr.	Dauer Min.	Vent. pro Min. ccm	CO ₂ -Gehalt des Teil- stroms %	O ₂ -Defizit im Teil- strom %	Pro Minute ccm		RQ.	Gew. g	g-cal. pro Min.	
					CO ₂	O ₂			absolut	pro kg
18	45	808,50	0,414	0,412	3,362	3,331	1,009	96	16,81	175,15
19	48	596,47	0,497	0,497	2,964	2,964	1,000	98	14,96	152,66
20	20	593,00	0,504	0,507	2,937	2,956	0,993	100	14,90	148,95
21	81	583,40	0,619	0,621	3,610	3,622	0,997	106	18,28	172,47
22	135	576,30	0,696	0,691	4,012	3,982	1,007	123	20,10	163,41
23	150	567,23	0,799	0,789	4,531	4,475	1,012	105	22,59	215,14

Wenn man mit *Danoff* (l. c.) die in den Versuchen gefundenen Respirationsquotienten mit den der gereichten Nahrung entsprechenden vergleicht, so findet man eine sehr gute Übereinstimmung. Während beim nüchternen Tier die respiratorischen Quotienten zwischen 0,67 (in diesen Versuchen hatten die Tiere mehrere Tage gehungert) und 0,73 liegen, tritt sowohl nach Eiweiß- und Kohlenhydratfütterung ein Ansteigen des Respirationsquotienten auf den der Nahrung entsprechenden Wert ein. Die Ergebnisse dieser Versuche können also als Beweis für eine genügende Genauigkeit der Methode angesehen werden.

Tabelle VII.

Nr.	Dauer Min.	Vent. in dieser Zeit Ltr.	CO ₂ -Gehalt im Teilstrom	Daraus berechnet CO ₂ -Gesamt- produktion ccm	Im Hauptstrom absorb. CO ₂		Differenz	
					mg	ccm	ccm	%
7	180	102,95	0,404	416,04	820	417,31	+ 1,27	+ 0,31
21	81	47,25	0,619	292,39	572	291,72	- 0,67	- 0,23
23	150	85,08	0,799	679,70	1332	677,97	+ 1,73	- 0,25

Wie schon oben beschrieben, ist mit dem Apparat eine doppelte Bestimmung der Kohlensäureausscheidung leicht zu bewerkstelligen. Die Versuche 7, 21 und 23, in denen ich eine derartige Doppelbestimmung vornahm, sind in der Tabelle VII nochmals mit den nötigen Daten ausgeführt. Aus der guten Übereinstimmung der Doppelbestimmungen der CO₂ geht deutlich hervor, daß die angewandte Methode der Teilstromabnahme auch in dieser Zusammenstellung beim kleinen Tier allen Anforderungen, die man an die Genauigkeit einer Methode stellen muß,

genügen dürfte. Da die Genauigkeit der CO_2 -Bestimmung eine so vorzügliche ist, kann kein Zweifel bestehen, daß auch der gefundene O_2 dem wirklichen Verbrauch entsprechen muß. Denn der Vorwurf, daß die gasanalytische Sauerstoffbestimmung über die Kohlensäure und den Stickstoff eine indirekte und somit ungenaue ist, wird dann hinfällig, wenn der durch die Gasanalyse berechnete Kohlensäurewert durch eine Wägung der insgesamt produzierten Kohlensäure bestätigt wird.

Zusammenfassung.

Es werden Versuche angegeben, die zeigen, daß der Zuntz-Geppert-Apparat bei geeigneter Anordnung auch bei kleinen Tieren eine genaue Bestimmung des respiratorischen Gaswechsels gestattet.

Über die Mobilisation der Mineralstoffe und des Stickstoffs aus Holz und Rinde beim frühjährlichen Austreiben.

Von

August Rippel.

(Aus dem agrikulturchemischen und bakteriologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 15. November 1922.)

Kürzlich habe ich gezeigt¹⁾, daß bei dem Austreiben von Zweigen im Frühjahr, bei Verhinderung einer Zufuhr von Nährstoffen, Stickstoff, Phosphor, Kalium in beträchtlicher Menge, Magnesium, Natrium in geringeren Mengen, Calcium, Chlor, Schwefel nicht oder nur in sehr geringen Mengen aus dem Stamm mobilisiert und in die austreibenden Blätter und Zweige transportiert werden, woraus sich also die Dreiteilung in

stark mobilisierbare	(K, P, N)
schwächer mobilisierbare	(Mg, Na)
stabile Elemente	(Ca, S, Cl)

ergab (S. 143). Es waren damit ältere Untersuchungen zum Teil bestätigt, zum Teil berichtigt und jedenfalls mit der angegebenen verbesserten Methodik teilweise richtiggestellt worden. Es wurde dort S. 135 darauf hingewiesen, daß auch die Frage, wie weit Rinde und Holz an dieser Mobilisation beteiligt seien, nur von *Schroeder*²⁾ dahin beantwortet worden war, daß N und P zu gleichen Teilen aus Stammholz und Stammrinde, K und Mg erheblich mehr aus dem Holz gelöst würden. Im übrigen braucht auf ältere Literatur, soweit sie hier überhaupt in Betracht kommen könnte, nicht eingegangen zu werden, da, wie schon in der früheren Arbeit betont, bei allen diesen Untersuchungen die Zweige im Verbands ihrer Pflanze blieben, somit nicht gesagt werden kann, wieviel der untersuchten Stoffe aus dem Stamm und wieviel aus dem Boden stammt; außerdem fehlen oft absolute Werte und die Angaben beziehen sich nur auf Prozentgehalt in der Trockensubstanz.

Es schien von Interesse, auch diese Frage mit verbesserter Methodik erneut zu prüfen. Es zeigte sich denn auch, daß diese Feststellungen von *Schroeder* jedenfalls nicht verallgemeinert werden dürfen, da sich hier, z. B. in Hinsicht auf das Kalium, ganz andere Verhältnisse herausstellten, nämlich eine *Speicherung in dem Holz* während der Mobilisation. Inwieweit jedoch die vorliegenden Ergebnisse allgemeinere Gültigkeit beanspruchen können, kann selbstverständlich ebenfalls nicht ent-

¹⁾ Diese Zeitschr. 118, 125, 1921.

²⁾ Forstchemische und pflanzenphysiologische Untersuchungen, Heft 1, S. 77.

schieden werden. Sie gelten vorerst nur für das betreffende Material, einjährige Zweige von *Sambucus nigra* L. und für den Fall, daß die Nährstoffaufnahme von den älteren Partien der Zweige und des Stammes und von den Wurzeln her ausgeschaltet ist.

Die Versuche wurden angestellt wie in der früheren Arbeit angegeben. Es wurden hier sechs möglichst gleichmäßige Portionen einjähriger, frisch geschnittener Zweige von *Sambucus nigra* von je 19 Zweigstücken im Portionsfrischgewicht von 536 bis 540 g eingeteilt, von denen drei sofort getrocknet wurden, nach der Trennung von Holz und Rinde durch sorgfältiges Abschaben, während die drei anderen Portionen in destilliertes Wasser gestellt wurden, so daß sie austreiben konnten. Danach wurden sie wie die anderen behandelt. Dauer des Versuchs vom 2. März bis 21. April 1921. Für jede Behandlungsweise waren also drei Parallelen vorhanden. Die Trockensubstanzbestimmung ergab in Grammen (Tabelle I):

Tabelle I.

	Rinde		Holz		Rindenabnahme		Holzabnahme	
	unaus- getrieben	aus- getrieben	unaus- getrieben	aus- getrieben	absolut g	%	absolut g	%
1	60,3	49,8	176,1	172,3	9,5	15,9	13,5	7,6
2	60,1	51,5	177,1	152,4	± 0,62	± 1,0	± 4,23	± 2,5
3	58,8	49,4	176,2	164,2				
Im Mittel	59,7 ± 0,38	50,2 ± 0,50	176,5 ± 0,26	163,0 ± 4,22				

Die ausgeführten Analysen finden sich in Tabelle II zusammengestellt, und zwar, aus Rücksicht der Raumersparnis, gleich auf die allein verwendbaren absoluten Zahlen (Gramm pro Portion) ausgerechnet. Tabelle III gibt dann weiterhin eine Übersicht der beobachteten Differenzen mit den nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz berechneten wahrscheinlichen Schwankungen. Es möge zunächst das Gesamtergebnis der mobilisierten Stoffe (also Rinde + Holz; Tabelle III, letzte Spalte) verglichen werden mit den in meiner früheren Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Man sieht diese durchaus bestätigt: eine deutliche, starke Abwanderung von Kalium, Phosphor, Stickstoff, ein Gleichbleiben bzw. nicht nachweisbares Abwandern von Magnesium, Natrium, Calcium¹⁾, Chlor, Schwefel. Daß eine Abwanderung von Magnesium hier nicht nachgewiesen werden konnte, liegt an dem einen merkwürdig hohen aber sicherlich nicht normalen Ergebnis (Tabelle II, Rinde Nr. 1, ausgetrieben), das jedoch bei Kontrolle ebenso gefunden wurde. Eine Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden.

¹⁾ Es mag allerdings nicht unerwähnt bleiben, daß man mit der Abwanderung allerdings relativ geringer Ca-Mengen unter Umständen zu rechnen haben wird, um so mehr, als gerade die Ca-Zahlen stets mit einer ziemlich großen Schwankung behaftet sind. Vgl. dazu auch S. 525.

Tabelle II.

		Rinde		Holz		Zusammen	
		unaus- getrieben	aus- getrieben	unaus- getrieben	aus- getrieben	unaus- getrieben	aus- getrieben
Ca O	1	0,929	0,878	0,352	0,305	—	—
	2	0,799	0,767	0,347	0,290	—	—
	3	0,790	0,833	0,326	0,259	—	—
Mittel . . .		0,840 ± 0,036	0,826 ± 0,024	0,342 ± 0,006	0,285 ± 0,016	1,182 ± 0,037	1,111 ± 0,030
Mg O	1	0,560	0,653	0,275	0,224	—	—
	2	0,547	0,517	0,285	0,189	—	—
	3	0,532	0,560	0,307	0,230	—	—
Mittel . . .		0,546 ± 0,006	0,577 ± 0,031	0,289 ± 0,007	0,214 ± 0,010	0,835 ± 0,009	0,791 ± 0,033
K ₂ O	1	1,206	0,940	0,199	0,248	—	—
	2	1,339	0,984	0,204	0,259	—	—
	3	1,305	0,910	0,210	0,264	—	—
Mittel . . .		1,283 ± 0,031	0,945 ± 0,016	0,204 ± 0,002	0,257 ± 0,004	1,487 ± 0,032	1,202 ± 0,017
Na ₂ O	1	0,084	0,080	0,113	0,121	—	—
	2	0,118	0,096	0,073	0,070	—	—
	3	0,062	0,089	0,074	0,122	—	—
Mittel . . .		0,088 ± 0,012	0,088 ± 0,003	0,087 ± 0,011	0,104 ± 0,014	0,175 ± 0,016	0,192 ± 0,014
P ₂ O ₅	1	0,438	0,291	0,348	0,236	—	—
	2	0,436	0,307	0,356	0,230	—	—
	3	0,438	0,297	0,337	0,248	—	—
Mittel . . .		0,437 ± 0,001	0,298 ± 0,003	0,347 ± 0,004	0,238 ± 0,004	0,784 ± 0,004	0,536 ± 0,005
N	1	1,994	1,384	0,757	0,658	—	—
	2	1,860	1,421	0,766	0,645	—	—
	3	1,808	1,378	0,700	0,690	—	—
Mittel . . .		1,887 ± 0,043	1,394 ± 0,011	0,774 ± 0,010	0,664 ± 0,010	2,661 ± 0,044	2,058 ± 0,015
SO ₂	1	0,289	0,256	0,167	0,224	—	—
	2	0,278	0,246	0,168	0,171	—	—
	3	0,268	0,253	0,197	0,197	—	—
Mittel . . .		0,278 ± 0,004	0,252 ± 0,002	0,177 ± 0,008	0,197 ± 0,011	0,455 ± 0,009	0,449 ± 0,011
Cl	1	0,022	0,021	0,019	0,032	—	—
	2	0,017	0,025	0,021	0,021	—	—
	3	0,019	0,022	0,023	0,023	—	—
Mittel . . .		0,0193 ± 0,0010	0,0227 ± 0,0010	0,021 ± 0,0010	0,0027 ± 0,0020	0,040 ± 0,0014	0,050 ± 0,0023

Wichtiger ist nunmehr für uns der Vergleich von Holz und Rinde, deren Zahlen, wie man sieht, durchaus nicht mit diesem Gesamtbild

Tabelle III.

Differenzen, ausgetrieben gegen unausgetrieben.

(Rechts unter jeder Zahl ist jeweils das Vielfache der wahrscheinlichen Schwankung angegeben.)

	Rinde	Holz	Zusammen
CaO . . .	− 0,014 ± 0,044 0,3	− 0,057 ± 0,017 3,4	− 0,071 ± 0,045 1,6
MgO . . .	+ 0,031 ± 0,032 1,0	− 0,075 ± 0,012 6,3	− 0,036 ± 0,033 1,1
K ₂ O . . .	− 0,338 ± 0,035 9,7	+ 0,053 ± 0,004 13,3	− 0,288 ± 0,036 8,0
Na ₂ O . . .	— —	+ 0,017 ± 0,017 1,0	+ 0,017 ± 0,017 1,0
P ₂ O ₅ . . .	− 0,139 ± 0,004 34,8	− 0,109 ± 0,005 21,8	− 0,248 ± 0,006 41,3
N	− 0,439 ± 0,044 11,2	− 0,110 ± 0,014 7,9	− 0,603 ± 0,046 13,1
SO ₃	− 0,026 ± 0,0045 5,8	+ 0,020 ± 0,014 1,6	− 0,006 ± 0,015 0,4
Cl	+ 0,0034 ± 0,0014 2,4	+ 0,006 ± 0,0024 2,5	+ 0,0094 ± 0,0028 3,3

in allen Fällen übereinstimmen. Was zunächst den *Phosphor* betrifft, so sehen wir einen gleichen Prozentgehalt der Anfangsmenge bei beiden mobilisiert: 31,8 % in Rinde, 31,4 % im Holz. Auf die verschiedenen Phosphorsäureformen wird weiter unten noch eingegangen werden. Beim *Stickstoff* betragen die entsprechenden Zahlen 26,1 und 14,2 %. Daß hier aus dem Holz prozentual erheblich weniger Stickstoff mobilisiert wird als aus der Rinde, erklärt sich aus dem Stickstoffarmut des Holzes (0,420 % gegen 3,112 % in der Rinde; vgl. Tabelle VII). Ein ganz anderes Bild zeigt jedoch das dritte leicht mobilisierbare Element, das *Kalium*. Mobilisation von 26,4 % in der Rinde, *Zunahme* um 28 % im Holz, welche Zunahme durch die wahrscheinliche Schwankung (wenn auch nicht vielleicht ganz in dieser Höhe, möglicherweise aber auch noch in größerer Höhe) durchaus gesichert ist (die Differenz beträgt laut Tabelle III das 13,3fache der wahrscheinlichen Schwankung). Durch weitere Kontrollanalysen wurde ferner jeder Verdacht einer etwaigen Probenverwechslung zerstreut.

Magnesium wurde aus dem Holz ebenfalls zu 26 % mobilisiert; die sehr wahrscheinlich auch in der Rinde stattgefundene Mobilisation tritt wegen der einen oben schon erwähnten abnorm hohen Zahl nicht in Erscheinung. *Natrium* ist innerhalb der Fehlergrenzen gleichgeblieben.

Calcium ist in der Rinde innerhalb der Fehlergrenzen ebenfalls gleichgeblieben, während im Holz eine sehr kleine Abnahme möglich wäre, die aber immerhin noch sehr unsicher bleibt, da die Differenz nur das 3,4fache der wahrscheinlichen Schwankung beträgt. Da jedoch auch diese Zahlen das Mittel aus mehreren weiteren Kontrollanalysen sind, die gleichsinnig ausfielen, so erscheint die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß durch die im Holz erfolgte Kalispeicherung etwas Calcium aus dem Holz abgedrängt worden ist, das sonst stabil geblieben wäre. Daß dies tatsächlich möglich ist, kann hier nur kurz angedeutet werden; ich werde in einer späteren Veröffentlichung auf diese Frage besonders eingehen.

Auch *Chlor* ist innerhalb der Fehlergrenzen gleichgeblieben. Die unwesentliche Zunahme erklärt sich ohne weiteres aus der Unmöglichkeit der genauen Bestimmung der sehr geringen Mengen. *Schwefel* ist im Holz gleichgeblieben, in der Rinde scheint die Menge etwas abgenommen zu haben; doch handelt es sich hier ebenfalls nur um sehr geringe Mengen, was die Unsicherheit zweifellos sehr erhöht.

Alles in allem dürfte das Bild in Rinde und Holz im großen und ganzen das gleiche sein wie es sich für die ganzen Zweige herausgestellt hat. Nur fällt völlig aus diesem Rahmen die unzweifelhaft eingetretene Kalispeicherung in dem Holz.

Bevor jedoch auf diese Frage noch weiter eingegangen wird, sollen noch einige Analysen mitgeteilt werden, die über die ursprüngliche Bindungsform der mobilisierten Kationen Aufschluß geben sollen, ob also einfach vorhandene anorganische Verbindungen abtransportiert werden¹⁾. Es wurde früher für die Zweige von *Salix* festgestellt, daß dies dort offenbar nicht der Fall war, da weder SO_3 noch Cl abnehmen, somit keine Sulfate oder Chloride abtransportiert waren. Betrachten wir den vorliegenden Fall, so kommt ebenfalls ein Abtransport von Chloriden nicht in Frage, da Chlor nicht abnimmt. Ferner kommen auch Sulfate im Holz gar nicht, in der Rinde kaum in Betracht. Denn selbst wenn wir, was nicht wahrscheinlich ist, annehmen würden, daß die in der Rinde gefundene abgewanderte Menge von 0,036 g SO_3 ursprünglich als Sulfat vorhanden und in dieser Form abgewandert sei, welche Abwanderung jedoch, wie oben betont, durchaus unwahrscheinlich ist, so würde diese Menge lediglich 0,030 g K_2O als K_2SO_4 entsprechen, während 0,338 g abgewandert sind. Unter keinen Umständen spielen also Sulfate quantitativ eine Rolle.

¹⁾ Um etwaigen Mißverständnissen vorzubeugen, sei nochmals ausdrücklich betont, daß ich hierunter nicht etwa verstehe, in welcher Form die Kationen wandern, sondern in welcher ursprünglichen Bindung sie in den nicht ausgetriebenen Zweigen vorhanden waren und ob sie von dort direkt als ursprünglich vorhandene anorganische Salze abwandern.

Es blieben also auch hier lediglich Phosphate übrig, wenn ursprünglich anorganisch gebundene Kationen bei der Mobilisation auswandern. Hier liegen allerdings die Verhältnisse hinsichtlich der Phosphorsäure etwas anders als bei meinen früheren Versuchen mit *Salix*.

Tabelle IV.

Absolute Menge der verschiedenen Phosphorsäureformen.

Rinde			Holz			Zusammen		
unaus- getrieben	aus- getrieben	mobi- liert %	unaus- getrieben	aus- getrieben	mobi- liert %	unaus- getrieben	aus- getrieben	mobi- liert %
1. Gesamt P_2O_5 .								
0,437 ± 0,001	0,298 ± 0,003	31,8	0,347 ± 0,004	0,238 ± 0,004	31,4	0,784 ± 0,004	0,536 ± 0,005	31,6
2. P_2O_5 löslich in 1proz. Essigsäure.								
1 0,257	0,184	—	0,243	0,150	—	—	—	—
2 0,248	0,190	—	0,234	0,165	—	—	—	—
3 0,280	0,175	—	0,238	0,169	—	—	—	—
ttel 0,262 ± 0,0074	0,183 ± 0,0032	30,1	0,238 ± 0,0018	0,161 ± 0,0046	32,0	0,500 ± 0,0076	0,344 ± 0,0056	31,1
3. P_2O_5 direkt aus Essigsäure fällbar.								
1 0,236	0,166	—	0,123	0,076	—	—	—	—
2 0,207	0,164	—	0,136	0,081	—	—	—	—
3 0,238	0,166	—	0,132	0,097	—	—	—	—
ttel 0,227 ± 0,0080	0,165 ± 0,0006	27,3	0,130 ± 0,0030	0,085 ± 0,0050	34,5	0,357 ± 0,0085	0,250 ± 0,0050	30,9
4. P_2O_5 organisch in Essigsäure löslich (Phytin?).								
0,035	0,018	48,6	0,108	0,076	30,0	0,143	0,094	34,2
5. P_2O_5 in 1proz. Essigsäure unlöslich [Eiweiß-P + Lecithin-P] ¹⁾ .								
0,180	0,114	36,7	0,104	0,088	15,4	0,284	0,202	28,9
Gesamtphosphorsäure gleich 100 gesetzt betragen:								
1 100	100	—	100	100	—	100	100	—
2 60,0	61,4	—	68,6	67,6	—	63,8	64,2	—
3 51,9	55,4	—	37,4	35,7	—	45,5	46,6	—
4 8,0	6,0	—	31,1	32,0	—	18,2	17,5	—
5 41,2	38,3	—	30,0	37,0	—	36,2	37,7	—

Die über die Bindungsform der Phosphorsäure ausgeführten Analysen zeigt Tabelle IV; die Trennung der Phosphorsäureformen geschah durch Lösung in Essigsäure und direkte Fällung mit Ammoniummolybdat nach bekannter Methode [vgl. meine Zusammenstellung²⁾].

¹⁾ Lecithinphosphor wurde, da es sich nur um sehr geringe Mengen handelt, nicht bestimmt.

²⁾ Diese Zeitschr. 103, 163, 1920.

Hierbei ist einiges auffallend. Zunächst ist zu beachten, daß der Prozentgehalt der mobilisierten Phosphorsäure bei allen Phosphorsäureformen der gleiche ist mit rund 30 %. Eine Ausnahme scheint die organisch gebundene essigsäurelösliche Phosphorsäure (Phytin ?) in der Rinde mit 48,6 % zu machen, was jedoch wohl nur daher kommt, weil hier, wie Tabelle IV zeigt, die absoluten Mengen sehr gering sind, so daß die Bestimmung, die hier ja aus der Differenz 2 zu 3 berechnet wird, unsicher sein muß. Ein gleiches gilt von der essigsäureunlöslichen Phosphorsäure (Eiweiß-Lecithin-Phosphor) im Holz, die aus der Differenz 1 und 2 berechnet wird. Im übrigen ist jedoch diese Übereinstimmung sehr auffallend. Es deutet dies ganz augenscheinlich darauf hin, daß zwischen den verschiedenen Phosphorsäureformen ein bestimmtes und einigermaßen konstantes Verhältnis bestehen dürfte, ein bestimmter Gleichgewichtszustand, der auch bei der Mobilisation erhalten wird. Wenn also anorganische Phosphorsäure weggeführt wird, wird aus organischer Bindung weitere anorganische frei werden können oder müssen. Gerade dieser Punkt scheint mir von einiger Bedeutung zu sein; es wird gleich auf ihn nochmals zurückzukommen sein.

Weiterhin fällt bei den hier mitgeteilten Analysen auf, daß die ursprünglich anorganisch gebundene Phosphorsäure hier sehr viel höher ist als bei meinen früheren Versuchen mit *Salix*. Nämlich 45,5 % der Gesamtposphorsäure in den nicht ausgetriebenen, 46,6 % in den ausgetriebenen Zweigen gegenüber den entsprechenden Zahlen 1,2 und 5,5 % bei *Salix*. Ferner enthält die Rinde sehr viel mehr anorganisch gebundene Phosphorsäure als das Holz, wie aus der Tabelle IV zu ersehen ist, wobei aber, wie schon erwähnt, das gegenseitige Verhältnis nach dem Austreiben dasselbe bleibt.

Da hier sehr viel anorganische Phosphorsäure vorhanden ist und nach den mitgeteilten Analysen auch auswandert, so erscheint es nicht nur möglich, sondern gesichert, daß ein Teil der Kationen ursprünglich in dieser Form vorhanden war und einfach abtransportiert wird. Denn es ist wohl ausgeschlossen, daß freie anorganische Phosphorsäure vorhanden ist. Wie große Mengen hier in Betracht kommen konnten, sei an dem Beispiel vom Kalium gezeigt: 0,248 g abgewandelter P_2O_5 würden entsprechen 0,327 g K_2O in Form von K_2HPO_4 und 0,164 g K_2O in Form von KH_2PO_4 gegen mobilisiert 0,288 g. Betrachtet man die Rinde allein, so stellen sich die Verhältnisse hinsichtlich der Bindungsmöglichkeit des Kaliums bedeutend ungünstiger, indem den abgewanderten P_2O_5 -Mengen von 0,139 g 0,184 g K_2O als K_2HPO_4 und 0,092 g als KH_2PO_4 entsprechen würden gegen abgewandert 0,338 g K_2O .

Ein durchaus einwandfreies Bild läßt sich also nicht gewinnen, da wir nicht wissen, in welcher Bindung das Kalium mit der Phosphorsäure in der Pflanze steht. Doch ist bei diesem Material mit Sicherheit zu

sagen, daß ein Teil der Kationen ursprünglich an anorganische Phosphorsäure gebunden war. Vergleicht man damit die früher von mir an *Salix* erhaltenen Ergebnisse, so geht daraus mit aller Deutlichkeit hervor, daß in solchen Fällen, in denen die anorganische Phosphorsäure fast völlig zurücktritt, die Bindung von Kationen durch diese eine ganz ähnliche sein dürfte, nur daß die Phosphorsäure ihrerseits wieder in organischer Bindung, wohl als Phytin oder in ähnlicher Weise steht. Sehr wichtig wäre hier auch, zu wissen, ob bei solch etwaigem Vorkommen von Phytinsäure diese in gleicher Weise wie z. B. in dem Phytin der Samen als Ca-Mg-Verbindung vorhanden ist oder etwa als K-Verbindung. Wäre nämlich Ca in dieser Bindung vorhanden, so müßte anzunehmen sein, daß das nicht abwandernde Ca zurückbleibt; es läge dann die weitere Annahme nahe, daß es gegen Kalium ausgetauscht wird. Doch sind diese Verhältnisse noch allzuwenig bekannt, als daß sie eingehender diskutiert werden könnten. Schließlich muß dabei auch noch im Auge behalten werden, daß auch kleine Mengen von Ca mobilisiert werden könnten, wenn diese auch nicht sehr erheblich sein können. Auch an die im Eiweiß vorkommende Phosphorsäure könnten natürlich noch Kationen gebunden sein, worüber jedoch noch nichts bekannt ist.

Alles in allem scheint jedoch ein Rest von Kationen zu verbleiben, der nicht ursprünglich an Phosphorsäure gebunden sein konnte, wie am besten die oben von der Rinde mitgeteilten Zahlen zeigen, was natürlich noch erheblich stärker zum Ausdruck kommt, wenn auch das Magnesium noch berücksichtigt wird¹⁾. Es ist also zu vermuten, daß noch andere organische Bindungsformen für die abgewanderten Kationen in Betracht kommen, und zwar ist in erster Linie an organische Säuren zu denken.

Doch sei vorerst noch auf einen Punkt eingegangen: Es geht aus den mitgeteilten Analysen hervor, daß die anorganische Phosphorsäure durchaus nicht restlos mobilisiert wird, sondern im Gegenteil nach der Mobilisation noch denselben prozentigen Anteil an der Gesamtphosphorsäure hat wie vorher. Erinnert man sich weiter der Tatsache, daß Sulfate (und Chloride) nicht abtransportiert werden, so läßt sich daraus wohl ein wichtiger Schluß ziehen: Offenbar hält die Pflanze diese anorganischen Salze sehr fest, bzw. regeneriert dieselben, wo ihr das, wie bei der Phosphorsäure möglich ist. Dann muß man aber annehmen, daß die Pflanze diese Salze als Bestandteile der Zellsaftvakuolen zur Erzielung eines gewissen osmotischen Druckes notwendig hat. Denn es kann sich, wie das Beispiel der Phosphorsäure zeigt, nicht nur um eine exkretive Ablagerung handeln, die nicht mehr in den Stoffwechsel einbezogen werden könnte. Obwohl diese Rolle der anorganischen

¹⁾ Noch verstärkt würden diese Schlüsse natürlich werden, wenn auch mit einer nicht unmöglichen Abwanderung geringer Ca-Mengen gerechnet würde (vgl. S. 519, Anm. 1).

Salze in der Pflanze allgemein bekannt ist, scheint man ihr doch zu wenig Beachtung zu schenken, da meist nur die *Verarbeitung* der anorganischen Elemente in Betracht gezogen wird, selten dagegen ihr Vorkommen in rein anorganischer Form. Daß im Zellsaft SO_4 -Ionen sowie Ionen der anorganischen Phosphorsäure vorkommen ist ebenfalls bekannt, wie man aus den bei *Molisch*¹⁾ und *Tunmann*²⁾ mitgeteilten mikrochemischen Beobachtungen ersehen kann [vgl. auch *A. Meyer*³⁾, S. 390]. Nichts bekannt ist dagegen über das quantitative Verhältnis derselben.

Einige gelegentlich von mir ausgeführte Analysen mögen daher an dieser Stelle mitgeteilt werden, die das Gesagte nach der quantitativen Seite wenigstens orientierend ergänzen. Bei den ganzen Pflanzen von *Tropaeolum maius* betrug der Prozentgehalt der Trockensubstanz an CaO 2,772, an SO_3 1,264. Von CaO waren 1,896 % (also 68,5 % der Gesamtmenge) mit kaltem Wasser extrahierbar und ebensoviel direkt aus dieser Lösung mit Ammoniumoxalat fällbar. Von SO_3 konnten aus einem wässrigen Auszug, nach Ansäuern mit Salzsäure 1,190 % in der Trockensubstanz, also 94,1 % der Gesamtmenge direkt mit Bariumchlorid gefällt werden, also nahezu die Gesamtmenge; denn die vorstehende Zahl dürfte sich noch erhöhen wenn die Fehler der Extraktionsmethode (Ausschütteln mit Wasser, Auffüllen, Bestimmung in einem aliquoten Teil) vermieden werden könnten. Es geht daraus hervor, daß hier eine große Menge von Sulfaten in der Pflanze vorhanden ist und eine organische Bindung des Schwefels hier offenbar quantitativ keine große Rolle spielt. Ob nun die Schwefelsäure ganz durch Calciumsulfat oder auch durch andere Basen abgesättigt ist, kann hier natürlich nicht entschieden werden. Jedenfalls aber kann es, wie ich früher für Blätter von *Sinapis alba* zeigte⁴⁾, vorkommen, daß, bei einer starken Anhäufung von Calciumsulfat, die dort durch Trockenkultur in nährstoffreicher Komposterde erzielt wurde, es direkt zu einer pathologischen Ausscheidung von Calciumsulfat in den Spaltöffnungen kommen kann.

Tabelle V zeigt weiterhin einige Zahlen von Blättern von *Sambucus nigra*. In der ersten Spalte der oberen Hälfte ist der Prozentgehalt der Trockensubstanz, in der zweiten der Prozentgehalt der Trockensubstanz an wasserlöslichen Stoffen, in der dritten der Prozentgehalt des Preßsaftes der Blätter (100 ccm) aufgeführt. Die Bestimmung der Wasserlöslichkeit wurde wie eben angedeutet ausgeführt. Der Preßsaft wurde aus den vorher in einer Reibschale etwas angequetschten Blättern hergestellt, wobei 475 g frische Blätter von einem Trockensubstanzgehalt

¹⁾ Mikrochemie der Pflanze. G. Fischer, Jena 1913.

²⁾ Pflanzenmikrochemie. Gebr. Bornträger, Berlin 1913.

³⁾ Morphologische und physiologische Analyse der Zelle. G. Fischer, Jena 1920.

⁴⁾ Über den Einfluß der Bodentrockenheit usw. Beitr. z. botan. Zentralbl. 36, 187, 1919.

von 21,7 % 120 ccm Saft ergaben, der einen Trockensubstanzgehalt von 14,54 % und einen Aschengehalt von 2,23 % (auf 100 ccm) hatte. Trockensubstanzgehalt der ausgepreßten Blätter 31,8 %. In der unteren Hälfte der Tabelle V sind in Spalte 2 der prozentige Anteil des wasserlöslichen Stoffes an dem Gesamtgehalt wiedergegeben; in Spalte 3 sind die Zahlen derselben Spalte der oberen Tabellenhälfte in Prozenten der Gesamtmenge in der Trockensubstanz angegeben.

Tabelle V.

	Blattrockensubstanz	Wasserlöslich	Blattpreßsaft
CaO . . .	3,175	0,281	0,248
MgO . . .	1,930	1,370	0,466
K ₂ O . . .	2,805	2,644	0,337
SO ₃ . . .	0,435	0,294	0,215
CaO . . .	100	8,8	1,32
MgO . . .	100	71,0	4,09
K ₂ O . . .	100	94,1 ¹⁾	2,04
SO ₃ . . .	100	67,6	8,37

Auffallend ist zunächst die sehr geringe Wasserlöslichkeit des Kalkes, der hier also größtenteils in schwer löslicher Form vorliegt. Dementsprechend sind auch nur geringe Mengen in den Preßsaft übergegangen. SO₃ dagegen, das in dem Gesamtgehalt der Trockensubstanz sehr gegenüber dem Kalk zurücktritt, erscheint in dem Preßsaft in relativ sehr großer Menge; und damit stimmt die hohe Wasserlöslichkeit überein. Wir haben also auch hier offenbar den größten Teil des Schwefels als Sulfat. Auch die im Vergleich zum Kalk erheblich mehr wasserlöslichen Mg und K treten diesem gegenüber im Preßsaft sehr hervor. Weiterhin ist noch zu bemerken, daß in dem Preßsaft auch Phosphorsäure in verhältnismäßig reichlichen Mengen vorkommt. Leider verunglückte die Bestimmung, so daß das genaue Ergebnis nicht quantitativ mitgeteilt werden kann. Wir können hieraus also schließen, daß in dem Preßsaft, der sicherlich zu einem großen Teil den Zellsaftvakuolen entstammt, Kationen reichlich in anorganischer Bindung als Sulfate und als Phosphate auftreten. Ob wir mit dieser Methode allerdings ein quantitativ richtiges Bild bekommen, sei dahingestellt. Ferner, daß uns die Wasserlöslichkeit eines Stoffes bei Behandlung der Trockensubstanz einen wichtigen Anhaltspunkt in dieser Richtung gewährt. Und weiterhin wird dadurch unsere oben ausgesprochene Vermutung, daß die bei der Mobilisation nicht wandernden anorganischen Salze, wie Sulfate, Bestandteile des Zellsaftes seien, gestützt.

¹⁾ Diese Zahl wird vielleicht 100 betragen müssen, da *Kostychev* (Zeitschr. f. physiol. Chem. 111, 228, 1920) gefunden hat, daß Kalium quantitativ wasserlöslich ist. Fehler der angewandten Extraktionsmethode (s. oben) dürften hieran schuld sein. In dem obigen Falle von *Tropaeolum* fand ich 94,23 % K₂O wasserlöslich.

Es ergibt sich hieraus eine weitere Frage: Es ist ja bekannt und wohl jetzt selbstverständlich, daß der osmotische Druck in der Pflanze nicht nur durch anorganische Salze, sondern, und vielleicht oft noch in stärkerem Maße, durch Zucker hergestellt wird. Trifft aber nun die obige Annahme zu, so müßte daraus eine Wechselwirkung von Zucker und Nährsalzen resultieren, d. h. wenn sehr viel Zucker zur Verfügung steht, würden weniger Nährsalze in dem Zellsaft gebraucht werden. Diese Meinung hat schon Pfeffer¹⁾ ausgesprochen, wenn er sagt: „Im Bereiche dieser und gewisser anderer Partialfunktionen wird ohne Frage öfters das für eine bestimmte Funktion unentbehrliche Element durch einen anderen Stoff, gelegentlich vielleicht sogar durch eine Kohlenstoffverbindung vertreten.“ Man wird durch diese Betrachtung zur bekannten Klebschen Theorie über die Bedeutung des Verhältnisses Zucker/Nährsalzen für das Eintreten der Blüte geführt. Es erscheint nicht ganz ausgeschlossen, daß die Klebsche Theorie somit zum Teil ein etwas anderes Gesicht erhalten könnte, indem nämlich bei reichlichem Vorhandensein von Kohlenhydraten das Eintreten des blühreifen Zustands auch dadurch mit herbeigeführt würde, daß eben in diesem Falle auf die gekennzeichnete Weise Nährsalze verfügbar würden. Denn es liegt zweifellos ein gewisser Widerspruch mit der Klebschen Theorie in der landwirtschaftlichen Erfahrungstatsache [ein gleiches teilt Benecke²⁾ mit], daß z. B. Phosphorsäure das Eintreten des blühreifen Zustands sehr befördert, es sei denn, daß man unter den Nährsalzen nur Stickstoffsalze versteht, auf die ja Klebs³⁾ ein besonderes Gewicht legt. Es wäre jedenfalls wünschenswert, dies genauer zu betonen und nicht mehr ganz allgemein von Nährsalzen zu sprechen.

Es wurde oben erwähnt, daß noch geprüft werden sollte, inwieweit organische Säuren bei der Mobilisation beteiligt sind. Eine genaue quantitative Bestimmung der in der Pflanze vorkommenden organisch sauren Salze ist nun aber zurzeit noch nicht möglich. Immerhin wird man jedoch erwarten können, daß die Bestimmung der Kohlensäure der Asche, bei sehr vorsichtigem Veraschen, einen ungefähren Anhaltspunkt in dieser Richtung liefert. Die in Tabelle wiedergegebenen Zahlen geben den CO₂-Gehalt in Gramm je Portion an; die Zahlen stellen also wiederum absolute Werte dar.

Tabelle VI.

	Rinde		Holz	
	unausgetrieben	ausgetrieben	unausgetrieben	ausgetrieben
1	0,995	0,867	0,158	0,181
2	0,974	0,845	0,159	0,184
3	0,906	0,914	0,157	0,154
Mittel	0,958	0,875	0,158	0,173
	± 0,021	± 0,015	± 0,000	± 0,008
Differenz	—	— 0,083	—	+ 0,015
	—	± 0,025	—	± 0,008

¹⁾ Pflanzenphysiologie 1, 405, Leipzig 1897.

²⁾ Botan. Zeitung 64 (II.), 97, 1906.

³⁾ Flora-Festschrift Stahl, S. 128. 1918.

In der Rinde scheint also eine Abnahme der organischen Säuren stattgefunden zu haben, wenn auch die Differenz nur das 3,3fache der wahrscheinlichen Schwankung beträgt, somit die Grenze der Sicherheit nur eben überschritten hat. Unter keinen Umständen ist diese Mobilisation organischer Säuren jedoch sehr erheblich. Die Differenzmenge von 0,083 g CO_2 würde, wenn wir die einfachste Beziehung COOK annehmen, 0,089 g K_2O entsprechen gegen mobilisiert 0,338. Ob es sich bei allen Pflanzen nur um solch geringe Mengen handelt, kann jedoch nicht entschieden werden.

Vergleicht man mit dieser in der Rinde festgestellten Abnahme die Zahlen des Holzes, so ergibt sich hier eine geringfügige Zunahme, die jedoch, als innerhalb der doppelten wahrscheinlichen Schwankung liegend, gänzlich unsicher ist. Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die absoluten Mengen sehr gering sind, so daß eine nicht sehr erhebliche Differenz nicht leicht über das Dreifache der wahrscheinlichen Schwankung hinausgehen kann. So beträgt die Differenz von 0,015 g 9,5 % der ursprünglichen Menge, während in der Rinde die sehr viel höhere Differenz von 0,083 g nur 8,7 % der ursprünglichen Menge beträgt. Berücksichtigt man noch, daß in dem Holz eine Abnahme für den Kalk gefunden wurde, so zeigt das, daß nicht zufällig die Trockensubstanz des Holzes zu hoch ausgefallen ist und sich dadurch ein Fehler eingeschlichen hat. Alles in allem glaube ich, daß man eine Zunahme an organischen Säuren im Holz nicht ganz von der Hand weisen kann. Es liegt dann durchaus nahe, diese Zunahme mit der gleichzeitig beobachteten Kalispeicherung im Holz in Zusammenhang zu bringen; daher soll auf diese Möglichkeit noch mit einigen Worten eingegangen werden.

Tabelle VII.

Die Trockensubstanz enthält in Prozenten:

	Rinde	Holz
K_2O . . .	2,149	0,110
CaO . . .	1,405	0,194
MgO . . .	0,913	0,164
P_2O_5 . . .	0,732	0,186
N	3,112	0,420

Was diese Kalispeicherung im Holz betrifft, so muß zunächst darauf hingewiesen werden, daß das Holz ganz außerordentlich arm an Kalium ist, wie Tabelle VII zeigt. Es fällt das besonders auf, wenn man diese Zahlen mit denen der Rinde vergleicht. Im Holz zeigt Kalium also die niedrigste Prozentzahl der wichtigen Pflanzennährstoffe; diese Zahl ist noch erheblich niedriger wie die von Stickstoff und Phosphorsäure, welch beiden ja ebenfalls für jüngere Zellen charakteristisch sind. Man vergleiche im Gegensatz hierzu die K_2O und P_2O_5 -Zahlen in der Rinde.

Die einfachste Annahme der beobachteten Kalispeicherung wäre nun die, daß einfach ein Teil des aus der Rinde auswandernden Kaliums auf dem Transportwege von der Analyse überrascht wurde und auf diese Weise, bei dem geringen Kaligehalt des Holzes, eine Speicherung, also einen physiologischen Vorgang, vortäuschte. Das ist allerdings wenig wahrscheinlich. Denn es würde sich bei den mehr gefundenen 0,053 g um 13,6 % der gesamten aus der Rinde abgewanderten Menge ($338 + 0,053$ g) handeln, unter Umständen noch außerdem zuzüglich einer gewissen Menge, die aus dem Holz sicherlich ebenfalls mobilisiert würde und die, bei einem Anfangsgehalt von 0,204 g und bei 25 % Mobilisation wieder 0,050 g ergeben würde, wodurch sich der obige Prozentsatz auf das Doppelte erhöhen würde. Es ist aber nicht anzunehmen, daß $\frac{1}{4}$ der gesamten aus der Rinde mobilisierten Menge auf einmal auf dem Transporte im Holz stecken könnte.

Viel wahrscheinlicher ist dagegen die Annahme, daß das Kalium in dem Holz gebraucht wird. Man wird so auf die Vermutung gedrängt, daß es hier mit dem Umsatz der Kohlenhydrate, die hier ja als Stärke reichlich abgelagert sind¹⁾, in irgend einer Beziehung stehe. Die Entstehung organischer Säuren bei intensivem Kohlenhydratumsatz wäre ja leicht verständlich. Diese Bedeutung des Kaliums wird ja vielfach angenommen, aber ebenso oft, wie in den botanischen Lehrbüchern, abgelehnt. Es erscheint mir daher nützlich, einmal darauf hinzuweisen, daß sich in den bekannten Zahlen von Wilfarth²⁾ ein sehr schöner Hinweis darauf findet, daß dem Kalium eine spezifische Wirkung auf die Bildung der Kohlenhydrate zukommen muß, wie man aus Tabelle VIII,

Tabelle VIII.

Zuckerrüben.

Zufuhr von	Zuckerrüben- Trockensubstanz g	Zuckergehalt in der Trockensubstanz g
Phosphormangel:		
0,028 g P_2O_5 . . .	3,2	60,7
0,053 g P_2O_5 . . .	6,6	61,1
0,130 g P_2O_5 . . .	103,8	65,1
Stickstoffmangel:		
0,145 g N	4,1	67,3
0,560 g N	19,5	71,7
2,940 g N	103,8	65,1
Kalimangel:		
0,00 g K_2O	2,7	22,0
0,140 g K_2O	7,9	40,0
3,290 g K_2O	103,8	65,1

¹⁾ Fettgehalt der unausgetriebenen Zweige I. 0,51 %.

²⁾ Zeitschr. d. Ver. d. deutsch. Zuckerind. 51, 983, 1901.

die nach *Wilfarthschen* Zahlen zusammengestellt ist, ersehen kann, worauf aber meines Wissens noch niemand aufmerksam gemacht hat. Trotz Stickstoff- oder Phosphormangel und einem sehr geringen Ertrag ist, wie man sieht, der prozentige Zuckergehalt hoch, während bei Kalimangel der Zuckergehalt ganz außerordentlich heruntergedrückt ist. In welcher Weise das Kalium hierbei wirkt und ob es sich bei meinem Versuch um ein ähnliches Prinzip handelt, das soll hiermit natürlich nicht entschieden werden, sondern es soll nur auf die Möglichkeit hingewiesen werden.

Zusammenfassung.

Wie früher für *Salix* konnte auch jetzt für *Sambucus nigra* festgestellt werden, daß K, P, N stark, Mg, Na schwächer, Ca, S, Cl sehr wenig oder nicht mobilisiert werden beim frühjährlichen Austreiben. Holz und Rinde verhalten sich dabei im wesentlichen gleich. Nur zeigt das Kalium ein verschiedenes Verhalten, indem in dem Holz eine Kalizunahme um 28 % nach dem Austreiben eingetreten war. Offenbar wird das Kalium in dem sehr kaliarmen Holz gebraucht. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß ihm eine Rolle bei dem Umsatz der Kohlenhydrate zufällt.

In Übereinstimmung mit *Salix* werden keine Sulfate und Chloride bei dem Austreiben abtransportiert; jedoch, im Gegensatz zu jener, anorganische Phosphate, die hier reichlich vorkommen, besonders in der Rinde. Ein Teil der abgewanderten Basen ist sicherlich ursprünglich an diese anorganische Phosphorsäure gebunden, ein anderer Teil an solche in organischer Bindung, etwa von phytinähnlichem Charakter. Ein weiterer Teil scheint an organische Säuren gebunden vorhanden zu sein und so abtransportiert zu werden. Ob alle mobilisierten Basen durch diese beiden Säuregruppen ursprünglich gebunden waren oder noch anderweitige Bindung in Betracht zu ziehen ist, kann nicht entschieden werden, da hierzu die Genauigkeit der vorliegenden Untersuchungen noch nicht groß genug ist.

Die ursprünglich in der Pflanze vorhandenen anorganischen Salze scheinen sehr fest gehalten zu werden, wie z. B. aus der Nichtmobilisierbarkeit von Schwefel hervorgeht. Es wird nämlich gezeigt, daß in der Pflanze der Schwefel hauptsächlich als Sulfat vorhanden ist. Anorganische Phosphorsäure wird zwar abtransportiert, aber dann wieder aus organischer regeneriert, so daß das Verhältnis der verschiedenen Phosphorsäureformen gewahrt bleibt. Diese anorganischen Salze bilden zweifellos einen wesentlichen Bestandteil des Zellsafts und sind hier teils wohl Exkretstoffe, teils aber sicherlich auch neben Zucker u. a. von aktiver, lebenswichtiger Bedeutung für die Pflanze für die osmotischen Verhältnisse.

Über den Einfluß der Schilddrüse auf einige toxische Glykämien.

Von

Kurt Holm und A. Bornstein.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Hamburg, Krankenhaus St. Georg.)

(Eingegangen am 22. November 1922.)

Die Tatsache, daß nach Schilddrüsenexstirpation eine Adrenalin-glykosurie schwerer zu erzielen ist als bei normalen Tieren, ist zuerst von *Eppinger, Falta* und *Rüdinger*¹⁾ beobachtet worden. Auch die Tatsache, daß eine Gefäßwirkung des Adrenalins bei thyreopriven Tieren sehr gering ist, war von diesen Autoren schon gefunden worden. Die Befunde sind seitdem vielfach — im Prinzip wenigstens — bestätigt worden; für ihre Bedeutung spricht, daß sie auch in der ausländischen Literatur, wenn auch unter Phantasienamen (*Goetsch*sche Reaktion), bekannt geworden sind.

Eppinger und seine Mitarbeiter erklären die Hemmung der Adrenalin-glykosurie nach Schilddrüsenexstirpation so, daß sie eine gegenseitige Förderung zwischen Schilddrüse und chromaffinem System annehmen. Man könnte also vermuten, daß in spezifischer Weise der Organismus thyreopriver Tiere für den durch das Adrenalin gesetzten Reiz weniger empfindlich ist und daher keine Zuckerausschüttung aus der Leber erfolgt. Man könnte aber auch annehmen, daß schilddrüsenlose Tiere für Reize überhaupt weniger empfänglich sind, daß sie also, wie auf andere Reize, so auch auf den durch das Adrenalin gesetzten Sympathikusreiz weniger leicht mit einer Glykämie reagieren als normale Tiere. Oder, daß nach Thyreoidektomie das Glykogen weniger leicht mobilisiert wird. Es handelt sich mit anderen Worten darum, ob bei der *Eppingerschen* Versuchsanordnung das Adrenalin in seiner spezifischen Eigenschaft als sympathikomimetisches Mittel oder als eins der vielen, Glykämie erzeugenden Gifte wirkt.

Zur Klärung dieser Frage war es wichtig, die Wirkung anderer zuckermobilisierender Gifte bei schilddrüsenlosen Tieren zu untersuchen. Von diesen schieden zunächst diejenigen aus, die durch Adrenalin-ausschwemmung aus den Nebennieren den Zuckerstoffwechsel

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med. 66.

beeinflussen. Wir wählten das Pilocarpin, von dem wir¹⁾ in einer früheren Arbeit bewiesen hatten, daß es auch bei nebennierenlosen Hunden eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels hervorruft, daß es also in seiner Wirkung unabhängig von den Nebennieren ist.

Versuchsordnung. Den Hunden wurde in Morphium-Chloroformnarkose die Schilddrüse entfernt unter möglichster Schonung der Parathyreoideae. Daß uns dies in genügender Weise gelang, ging daraus hervor, daß wir niemals Erscheinungen von Tetanie beobachteten. Einige Tage nach der Operation begannen wir mit den Versuchen, bei einigen Tieren waren schon vor der Operation Blutzuckerbestimmungen unter Adrenalin- und Pilocarpinverabreichung angestellt worden. Die Blutzuckerbestimmungen wurden stets ausgeführt, nachdem die Hunde wenigstens 16 Stunden keine Nahrung mehr zu sich genommen hatten. Das Blut wurde immer aus einer kleinen Ohrvene entnommen und nach der *Bangschen* Mikromethode analysiert, gleichzeitig wurde Hämoglobin mit dem *Authenriethschen* Kolorimeter bestimmt. Es standen uns im ganzen fünf schilddrüsenlose Hunde zur Verfügung.

Wir geben zunächst in Tabelle I die Versuche wieder, in denen wir die Angaben *Eppingers* durch Blutzuckerbestimmungen zu bestätigen versuchten. Es war uns aus früheren Versuchen²⁾ bekannt, daß die Dosis von 0,18 mg Adrenalin pro Kilogramm Hund normalerweise eine mittlere Steigerung des Blutzuckers hervorruft, die schon nach 7 Minuten deutlich ist und mehrere Stunden anhält. Gaben wir die gleichen Mengen unseren schilddrüsenlosen Hunden, so fanden wir nur in einem von drei Fällen eine sofort einsetzende Glykämie, während bei den beiden anderen der Blutzucker in der ersten Stunde nicht anstieg, einmal sogar etwas sank. Erst in der zweiten Stunde fand sich in allen Versuchen eine mäßige Glykämie. Unsere Versuche sprechen also durchaus im Sinne *Eppingers*, daß durch Schilddrüsenexstirpation die Wirkung des Adrenalins auf den Zuckerstoffwechsel verzögert wird.

In Tabelle II sind die Versuche mit 0,6 mg Pilocarpin pro Kilogramm an operierten Tieren wiedergegeben. Wir wählten diese Mengen, weil sie die kleinsten sind, mit denen man mit einiger Sicherheit gerade eine leichte Erhöhung des Blutzuckers erzielen kann³⁾. Wir haben sechs Versuche an strumektomierten Hunden angestellt. In fünf von diesen Versuchen ist der Blutzucker in der ersten Stunde unverändert geblieben, in der zweiten Stunde stieg er nur bei einem dieser fünf Versuche noch etwas an. Die Tiere waren also dem Pilocarpin gegenüber in der Blutzuckerwirkung weniger empfindlich als normale Hunde. Dagegen blieben die Tiere in der Salivation nicht sehr stark hinter normalen Tieren zurück.

¹⁾ Diese Zeitschr. 132, 138.

²⁾ Bornstein und Vogel, diese Zeitschr. 126, 57.

³⁾ Ebendasselbst, S. 59.

Gehen wir erheblich über die Grenzdosen hinaus, so sind die Unterschiede zwischen normalen und operierten Tieren nicht ganz so deutlich. Immerhin beträgt bei 2 mg Pilocarpin pro Kilogramm Tier die Erhöhung des Blutzuckers im Mittel 95 %¹⁾, bei den schilddrüsenlosen Tieren im Mittel nur 62 % (s. Tabelle III).

Genau wie die Adrenalinwirkung, so ist auch die Pilocarpinwirkung auf den Zuckerstoffwechsel gehemmt, und zwar ist die Hemmung

Thyreoidektomierte Hunde.

↓ = Injektion.

		- 1h 30' vorher	+ 15'	- 30'	+ 1h	+ 2h	Nach Injektion
<i>Tabelle I.</i> 0,18 mg Adrenalin pro Kilogramm.							
		-2h 30'					
1. Nelly	16. XII.	0,070	0,065	0,055	0,054	0,036	0,096
2. Max	3. I.	—	0,087	0,112	0,116	0,150	0,154
3. Mäxin	2. I.	—	0,086	0,074	0,078	0,093	0,132

Tabelle II. 0,6 mg Pilocarpin pro Kilogramm.								
1. Pinscher	28. XI.	0,068	0,089	—	0,079	0,078	0,076	Kein Speichel
2. Nelly	28. XI.	0,086	0,098	—	0,095	0,083	0,091	Mäßig Speichel
		—1h15'						
3. Max	17. XII.	0,062	0,055	—	0,042	0,079	0,079	Speichel, Kot
4. Nelly	5. I.	—	0,098	0,102	0,104	0,104	0,091	Speichel, Kot usw.
5. Emil	13. I.	—	0,068	—	—	0,069	0,077	Speichel, Erbrechen Kot
		—1h40'						
6. Mäxin	16. XII.	0,111	0,101	—	0,121	0,102	0,106	Wenig Speichel

Tabelle III. 2,0 mg Pilocarpin pro Kilogramm.								
1. Pinscher	3. XII.	—	0,055	—	0,079	0,085	0,066	Speichel, Erbrechen
2. Nelly	3. XII.	—	0,085	—	0,133	0,115	0,093	Speichel, Erbrechen Kot, Urin
		—1h 10'						
3. Max	21. XII.	0,108	0,095	—	0,144	0,170	0,151	dasselbe
		—45'						
4. Mäxin	14. XII.	0,094	0,104	—	—	0,153	0,181	dasselbe

beider Giftwirkungen nicht eine völlige, bei beiden Giften aber etwa von der gleichen Größenordnung. Wir haben früher (l. c.) auseinandergesetzt, daß die Pilocarpinwirkung auf den Zuckerstoffwechsel nicht durch Mobilisation von Adrenalin zu erklären ist, und daß sie überhaupt nicht mit der Adrenalinwirkung wesensgleich sein kann. Daraus müssen wir den Schluß ziehen, daß nach Schilddrüsenexstirpation die Fähigkeit, das Glykogen zu mobilisieren, allgemein verloren gegangen oder vermindert ist, und zwar wird nicht nur auf Sympathikusreiz, sondern auch auf Parasympathikusreiz das Glykogen schlechter als normal in Zucker verwandelt.

¹⁾ Bornstein und Holm, diese Zeitschr. 132, 144, Tabelle IV.

Schließlich haben wir noch den Antagonismus zwischen Adrenalin und Pilocarpin untersucht. Es war von *Vogel* und *Bornstein*¹⁾ beschrieben worden, daß Adrenalin und Pilocarpin zwar jedes für sich eine Glykämie hervorrufen, daß aber beide Gifte, gleichzeitig gegeben, sich in ihrer Wirkung auf den Blutzucker aufheben. Dieses Verhalten haben wir in vier Versuchen untersucht. Es hatte sich nicht verändert. Auf die Wiedergabe der Protokolle, die genau den früher veröffentlichten an normalen Tieren (l. c.) entsprechen, möchten wir verzichten.

Zusammenfassung.

Ebenso wie die Adrenalinglykämie ist auch die Pilocarpinglykämie bei schilddrüsenlosen Hunden verzögert. Da die Pilocarpinglykämie sicher nicht von den Nebennieren abhängig ist und überhaupt prinzipiell anderer Natur ist als die Adrenalinglykämie, so folgt daraus, daß nach Schilddrüsenexstirpation die Mobilisierung des Glykogens durch die verschiedenartigen nervösen Reize erschwert ist.

¹⁾ *Vogel* und *Bornstein*, diese Zeitschr. 126, 37, Tabelle I.

Untersuchungen über die Wirkungsweise von Formaldehyd auf Organkolloide.

II. Mitteilung.

Formaldehyd und Eiweißquotient.

Von

H. Kürten.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik zu Halle a. d. S.)

(Eingegangen am 22. November 1922.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer früheren Arbeit war die Rolle des Formaldehyds bei der Aufhebung der Reaktionsfähigkeit luetischer Sera untersucht worden (1). Es hatte sich ergeben, daß die Wirkung des Formaldehyds *in vitro* in ihrer ersten Auswirkung eine heterogene ist, die jedoch bei der gegebenen Versuchsanordnung für die Extraktlipide praktisch nicht in Frage kommt. Lediglich die Serumproteine als Träger der kolloiden Eigenschaften erfahren eine Zustandsänderung. Diese, in einer regelmäßigen, mehr oder minder bedeutenden Viskositätssteigerung bestehend, war mittels der Osmometerzelle als Entquellung erkannt worden. Durch sie wird offenbar ganz vorwiegend die Reaktionsfähigkeit luespositiver Sera mit den Extraktlipiden zunichte gemacht. Es kann darüber hinaus nach den weiteren Versuchsergebnissen angenommen werden, daß für die gefundene Formaldehydwirkung auch im heterodispersen Mischkolloid des *unverdünnten* Serums ganz vorwiegend, wenn nicht ausschließlich, die Proteinteilchen in Betracht kommen.

Bei Erörterung der weiteren Frage nach den Gründen für eine besondere Reaktionsfähigkeit der luetischen Sera gegenüber dem Formaldehyd, wie sie beispielsweise auch in der Reaktion von *Gaté* und *Papacostas* zum Ausdruck gelangt, war bereits an Hand vergleichender Versuche am Serum und Plasma sowie unter Berücksichtigung der betreffenden Literatur die Vermutung ausgesprochen worden, daß der Globulinfraction dabei eine eigene Rolle zukommt. Die vorliegenden Untersuchungen galten der weiteren Klärung dieser noch offenen Frage. Ich konnte bereits darauf hinweisen und habe in der Folgezeit weiter bestätigt gefunden,

daß die von *Gaté* und *Papacostas* angegebene Reaktion keineswegs für Lues spezifisch ist. So gab ein Serum von Endocarditis lenta mit einem Eiweißgehalt (berechnet) von 8,26 % mit neutralem Formaldehyd eine sofortige Gelatinierung. Wie sich in Verfolgung dieser Beobachtung herausstellte, war diese besondere Reaktionsfähigkeit auch nicht in erster Linie von dem Eiweißgehalt des Serums als solchem abhängig. So gab beispielsweise auch ein Plasma mit einem Eiweißgehalt von nur 4,67 % ebenfalls sofortige Gelatinierung, während diese bei dem Serum derselben Patientin ausblieb. Die quantitative Fibrinbestimmung im Plasmen nach *Gram* (2) ergab den hohen Wert von 0,59 %. Zwischen den angeführten beiden extremen Eiweißwerten fanden sich alle Übergänge mit Gelatinierung auf Formaldehydzusatz. Stets aber waren es Sera bzw. Plasmen, bei denen es sich nach eigenen Bestimmungen des Eiweißquotienten oder nach den Angaben der Literatur um eine Verschiebung dieses Quotienten im Sinne einer Vergrößerung der Globulinfraction, sei es als Pseudo- und Euglobulin, sei es als Fibrinoglobulin handelte.

Diese Beobachtungen mußten nunmehr experimentell geprüft werden. Versuchsweise habe ich darum durch Flockung mit Ammonsulfat bei Halb- bzw. Gansättigung die Globulin- und Albuminfraction verschiedener Sera isoliert und nach Wiederauflösung in Kochsalzlösung getrennt untersucht. Dabei zeigte sich das Globulin gegenüber dem Formaldehyd besonders reaktionsfähig. Es bildeten sich gewöhnlich unmittelbar nach Zusatz große, grobe Flocken, die eine Neigung zur Verklumpung zeigten und sehr leicht sedimentierten. Bei dem Albumin trat zwar stets auch eine Flockenbildung auf, doch gewöhnlich erst nach längerer Zeit, und dann war sie feinflockiger und ließ jede Neigung zur Sedimentierung auch noch nach Tagen vermissen. — Dieses Vorgehen konnte aber auch keinen befriedigenden Aufschluß über eine besondere Reaktionsfähigkeit des labileren und gröber dispersen Anteils der Serumeiweißkörper geben, um so weniger, als einmal durch das zur Reinigung erforderliche Umfällen die Eiweißkörper wenigstens teilweise denaturiert werden und dann auch die Besatzung des Reaktionsgemisches, wie ich bereits früher zeigen konnte, für die Formaldehydwirkung eine nicht unwesentliche Rolle spielt.

Am besten geeignet erschien mir daher die Prüfung der Formaldehydwirkung am gleichen Serum unter verschiedenen Bedingungen.

Moll (3) hat ein Verfahren angegeben, nach dem es möglich sein soll, durch zweistündiges Erhitzen im Thermostaten bei 60° C den Serumeiweißquotienten zugunsten des Globulins zu verschieben. Es ist dazu zu sagen, daß im allgemeinen die Albuminfraction sich durch einen höheren Schwefelgehalt und das Fehlen von Glykokoll auch chemisch von dem Globulin unterscheidet, welch letzteres bei der Hydrolyse Glykokoll liefert und weniger Schwefel aufzuweisen hat. Ob ein solch weitgehender innerer Umbau bei dem wie oben behandelten Serum statthat, darf dahingestellt bleiben. Es ist jedenfalls nicht von der Hand zu weisen, daß sich durch bestimmte Eingriffe ein verändertes Verhalten der Eiweißkörper gegenüber den üblichen Fällungsmitteln erzielen läßt. So hat *Mörner* z. B. gezeigt (4), daß ein

Zusatz von Seifen die Fällbarkeit des Serumglobulins verändern kann. Man wird also mit Einflüssen rechnen müssen, die zu einer stärkeren Labilisierung der Serumeiweißkörper führen, auch ohne die gleichzeitigen oben angeführten chemischen Umlagerungen. Den Löslichkeits- und Fällbarkeitsverhältnissen kommt eben als Unterscheidungsmerkmal zwischen verschiedenen Gruppen von Eiweißstoffen nur untergeordnete Bedeutung zu (5), und *Abderhalden* (6) erörtert die Möglichkeit, daß nach dem jetzigen Stand unserer Methoden eine ganze Anzahl von Proteinen die gleichen Fällungsgrenzen aufweisen können.

Diesen Schwierigkeiten entgehen wir, wenn wir den Dispersitätsgrad mit seinen Korrelaten aus der Reihe der Kriterien herausgreifen und in den Mittelpunkt unserer Betrachtung rücken. Wir finden dann einen gleichmäßigen Übergang der Fällbarkeit der Serumproteine von dem hoch dispersen und stabilen sogenannten Albumin zu dem labileren und gröber dispersen Globulin bis hinab zu dessen leichtest fällbaren Anteil, dem sogenannten Fibrinogen oder Fibrinoglobulin.

So betrachtet, wird durch die vorerwähnte Behandlung des Serums eine Labilisierung erzielt. *Moll* konnte durch Fällungsanalysen eine solche feststellen für das Pferdeserum, weniger regelmäßig für das Hunde- und noch seltener für das Kaninchenserum. Es bestehen nach ihm also Unterschiede für die einzelnen Tierarten. Ich habe menschliches Serum in gleicher Weise behandelt und stets eine Vermehrung der leichter fällbaren Serumeiweißbestandteile beobachtet. In Anwendung kam — da mir ein Refraktometer für die elegante *Naegeli*sche Methode der Bestimmung des Mischungsverhältnisses von Albumin und Globulin (7) nicht zur Verfügung stand — die zwar exakte, aber viel umständlichere Methode der fraktionierten Fällung durch Ammonsulfat von *Hofmeister-Pohl* (8). Von einer Trennung in Pseudoglobulin und Euglobulin, wie *Moll* das tut, habe ich dabei aus den oben angeführten Gründen Abstand genommen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist der Verbrauch an Untersuchungsmaterial, das nicht immer in den erforderlichen Mengen zur Verfügung steht. Ich habe mich deswegen lediglich auf die Feststellung der vermehrten Labilisierung beschränkt. Wie wir durch die Untersuchungen von *Naegeli*, *Rohrer* und *Alder* (9) wissen, ist eine solche Vermehrung stets auch mit einer Viskositätszunahme eng verknüpft. Die stabileren und höher dispersen Serumbestandteile (Albumine) sind stets weniger viskös als die gröber disperse und labilere Globulinfraktion. Die Vereinigung der Fällungsmethode bei dem normalen und erhitzten Serum einerseits mit der viskosimetrischen Messung andererseits, gab mir eine Möglichkeit, bei verschiedenem Gehalt des durch Halbsättigung flockbaren Eiweißes im sonst gleichen Gesamtserum das Verhalten gegenüber Formaldehyd zu studieren. Zunächst geht aus der Tabelle I hervor, daß es gelingt, den Eiweißquotienten des normalen Serums durch zweistündiges Er-

hitzen im Sinne einer Vermehrung des bei Halbsättigung durch Ammonsulfat ausfallenden Globulins zu verschieben. Weiterhin ist ersichtlich, daß die relative innere Reibung des erhitzten Serums in enger Beziehung steht zu dem Grade der bewirkten Vermehrung.

Dieselben Sera wurden dann in genau gleicher Weise wie in der früheren Arbeit mit dem Viskosimeter auf ihr Verhalten gegenüber dem Formaldehyd geprüft. Die Resultate gehen ohne weiteres aus Tabelle II und der Abbildung hervor und zeigen an, daß die Formaldehydwirkung um so intensiver ist, je stärker die Vermehrung der sogenannten Globulinfraktion auftritt.

Tabelle I.

Nr.	Serum	Unbehandelt		η des Gesamtserums	2 Std. erhitzt b. 60° C		η des Gesamtserums
		Globulin	Albumin		Globulin	Albumin	
1	Ge . . . e ¹⁾ . . .	0,1595	0,7774	1,76	0,1803	0,7445	1,79
2	Ra d . . .	0,3499	n. best.	1,72	0,5001	n. best.	1,81
3	B . . . dt . . .	0,3280	0,8995	1,83	0,4405	0,7800	2,47
4	Kei . . l	0,0996	0,3273	1,75	0,2702	0,1516	3,34
5	Ro n . . .	0,6588	0,2963	2,01	0,9158	0,0325	9,02
6	Hu s . . .	0,3258	0,3934	1,71	0,6651	0,0594	6,73
7	Mo . . . g	0,3754	0,6187	—	0,8168	0,1649	—

¹⁾ Serum zwei Stunden erhitzt bei nur 53° C.

Tabelle II.

Nr. a) normal b) erhitzt	η des reinen Serums	Relative innere Reibung auf Zusatz von verdünntem neutralen Formaldehyd			
		nach 5'	nach 10'	nach 20'	nach 30'
1. a)	1,76	2,16	2,17	2,22	2,28
b)	1,79	2,17	2,21	2,26	2,29
2. a)	1,72	2,22	2,33	2,45	2,52
b)	1,81	2,33	2,49	2,63	2,77
3. a)	1,83	2,33	2,41	2,45	2,48
b)	2,47	3,20	3,37	3,58	3,67
4 a)	1,75	2,13	2,20	2,25	2,26
b)	3,34	4,95	5,48	5,72	5,90
5. a)	1,71	2,00	2,05	2,09	2,11
b)	6,73	15,71	nicht mehr meßbar		
6. a)	2,01	3,39	3,61	4,00	4,17
b)	9,02	sofortige Gelatinierung			

Im Gegensatz zu *Moll* fand ich für die Summen der Globulin- und Albuminfraktionen der erhitzten stets einen geringeren Wert als bei den unbehandelten Seren. Möglicherweise sind Abbauvorgänge hierfür verantwortlich zu machen. Die Bestimmung des Reststickstoffs (im Trichloressigsäurefiltrat) gab jedoch keinen Beleg dafür.

Es war bereits darauf hingewiesen worden, daß die von *Gaté* und *Papacostas* angegebene Syphilisreaktion *nicht* spezifisch ist. Sie ward auch seither in Fällen, die mit einer Vermehrung der labilen Serumeiweißkörper einhergehen, sehr häufig positiv gefunden. Wenn aber der positive Ausfall dieser Reaktion ebenso wie bei der Formaldehydkontrolle ganz allgemein auf die besondere Reaktionsfähigkeit der Globuline zurückzuführen ist, so war zu erwarten, daß die Reaktion auch in den Fällen mit künstlich vermehrter labiler Eiweißfraktion positiv ausfiel. Dies trifft in der Tat zu.

Es muß an dieser Stelle noch zweier Arbeiten gedacht werden, die zwar von durchaus anderen Voraussetzungen ausgehen und auch zu andersartigen Resultaten gelangen, die aber doch mit den vorliegenden Untersuchungen das Studium der Formaldehydwirkung auf native Eiweißkörper zum Gegenstand haben.

Obermayer u. *Willheim* (10) waren im Verlauf von Enzymstudien mittels der *Sörensen*schen Formoltitration zu der Annahme gelangt, „daß das Eiweiß als solches formoltitrierbar sei, d. h. daß seine Reaktion nach Zusatz von neutralem Formaldehyd sich nach der sauren Seite hin verschiebe“.

Methodisch gingen die Autoren bei Prüfung dieser Annahme in folgender Weise vor: Die zu titrierende native (kolloide) Eiweißlösung wurde mit HCl gegen Lackmus neutral eingestellt und dann nach Zusatz von $\frac{1}{2}$ proz. alkoholischer Phenolphthaleinlösung als Indikator und von neutralem Formaldehyd, wie bei Titration der Aminosäuren, mit $n/4$ NaOH bis zum Umschlag titriert. Das Resultat war nach dem Versetzen mit neutralem Formaldehyd in allen Fällen das Auftreten einer stark sauren Reaktion, die mittels der Titration quantitativ bestimmt wurde. Diesen Wert betrachten die beiden Forscher als „ein

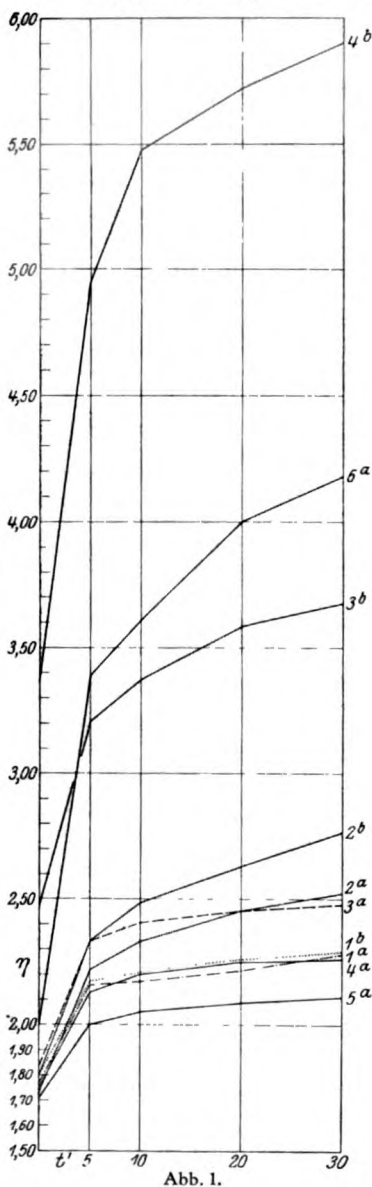


Abb. 1.

Maß für die in der verarbeiteten Eiweißmenge enthaltenen endständigen Aminogruppen mit Ausnahme der in säureamidartiger Bindung stehenden CONH_2 -Gruppe“. Indem sie die Anzahl Kubikzentimeter $n/4$ NaOH,

die bei der Bestimmung des Gesamt-N nach *Kjeldahl* verbraucht werden, dividieren durch diejenigen, die sich bei der Formoltitration ergeben, werden Gesamt-N und endständige Aminogruppen zueinander in Relation gebracht. Dieser Quotient heißt der „*Aminoindex*“ des betreffenden Eiweißkörpers.

Das nächste Ergebnis dieser Untersuchungen war ein relativ viel größerer Aminoindex des Globulins als des Albumins, beim Pferde z. B. 21 bzw. 13. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich mit gewissen, aber gleichsinnigen Schwankungen für eine Reihe anderer Säuger. Für das Haushuhn fanden die Autoren Werte für Globulin und Albumin, die in gleicher Weise verschieden waren, aber absolut höher lagen. Die Darstellung weiterer Unterfraktionen aus den drei Hauptfraktionen mittels verschiedengradiger und steigender Sättigung führte zu kontinuierlich abnehmenden Werten des Aminoindex.

Auf das Wesen der „*Säurigkeit*“ des Eiweißes nach Formaldehydzusatz kann hier nicht eingegangen werden. Nach der Definition des Aminoindex entspricht bei den Globulinen einem hohen Wert die geringere, bei den Albuminen einem niedrigen Wert die größere „*Säurigkeit*“ des Eiweißes. Den Autoren erscheint bei ihrem Vorgehen allein die Anlagerung des Formalins an freie Aminogruppen und die damit verbundene Bildung von Methylenverbindungen eine wesentliche Zunahme der Azidität des Eiweißes hervorrufen zu können. Zum Beweise dafür desamidierten sie Eiweiß, ehe sie Formaldehyd einwirken ließen. Zu diesem Zwecke bedienten sie sich des von *Schiff* (11) angegebenen Verfahrens mit NaNO_2 und Essigsäure:

Lösungen des Albumins werden mit wenigen Gramm NaNO_2 versetzt, auf 90°C (!) erwärmt und allmählich Essigsäure von 25 % in kleinen Anteilen zugefügt. Das Produkt ist eine strohgelbe Verbindung, die nur in konzentrierter Schwefelsäure löslich ist.

Ein Verfahren also, bei dem die Eiweißkörper denaturiert (koagulierte) und chemisch weitgehend verändert werden müssen! Ich habe nun selbst in meinen Untersuchungen über die Formaldehydwirkung auf das kolloide Serumeiweiß in erster Auswirkung stets eine Zustandsänderung im Sinne einer Entquellung feststellen können. Aus den Versuchen über Salz- und Säurezusatz geht hervor, daß die Säurewirkung die Entquellung hemmt. Es kann auch aus diesem Grunde die auftretende Säurigkeit für die Zustandsänderung nicht in Frage kommen. Wenn man das Serumeiweiß nach Zusatz weniger Tropfen Essigsäure in der Hitze koaguliert, das Koagel (*Abderhalden*) auf dem Filter säurefrei wäscht, es in Aqua destillata aufschwemmt und nunmehr dem nicht desamidierten, sondern nur denaturierten Eiweiß Formaldehyd zusetzt, so bleibt in Übereinstimmung mit meinen experimentellen Ergebnissen seine am kolloiden Eiweiß regelmäßig zu beobachtende Wirkung auch noch nach Stunden aus. Die interessanten Ergebnisse *Obermayers* und *Willheims* stehen also hinsichtlich eines

kontinuierlich veränderten Verhaltens der kolloiden Eiweißkörper vom stabilen Albumin bis hinab zur labilsten Gruppe des Globulins gegenüber dem Formaldehydzusatz im besten Einklang mit der hier aufgezeigten Abhängigkeit der Formaldehydwirkung vom Labilitäts- bzw. Dispersitätsgrad der kolloiden Eiweißkörper.

Folgerungen.

Nachdem in der ersten Mitteilung gezeigt werden konnte, daß der Formaldehyd in vitro eine Zustandsänderung der Serumeiweißkörper bewirkt und in der vorliegenden zweiten Mitteilung der Nachweis gelungen ist, daß diese Wirkung in besonders hohem Maße auf die gröber dispersen und labileren Anteile dieser Eiweißkörper zutrifft, sei im folgenden auf Grund dieser gefundenen Tatsachen die Möglichkeit einer vielseitig behaupteten, nirgends aber erwiesenen „innerdesinfektorischen“ Wirkung des Formaldehyds erörtert. Auf die Unwahrscheinlichkeit einer direkten Bakterienwirkung im Blute oder auch in anderen Körperflüssigkeiten lebender Organismen habe ich früher bereits kurz hingewiesen.

Dafür sprechen auch die Untersuchungen von *Hanzlic* und *Collins* (12), in denen es niemals gelang, nach Verfütterung von Hexamethylentetramin freien Formaldehyd im Blute nachzuweisen. Auch nach *Trendelenburg* (13), dem wir quantitative Messungen über die Spaltung des Hexamethylentetramins verdanken, ist die im hexamethylenhaltigen Blute frei enthaltene Formaldehydmenge außerordentlich gering und Colibakterien werden bei einem Gehalt des Blutes an Hexamethylentetramin bis zu 1% innerhalb 16 Stunden nicht abgetötet, sondern höchstens in ihrer Entwicklung gehemmt. Zu demselben negativen Ergebnis ist neuerdings auch *Voit* (14) gekommen. Wie *Trendelenburg* nachwies, begünstigen hohe H-Ionenkonzentrationen die Zerfallsgeschwindigkeit des H' in Formaldehyd und NH_3 sehr stark. Die Geschwindigkeit sinkt mit fallender H-Ionenkonzentration. Aber selbst bei neutraler Reaktion wird ein noch meßbarer Anteil des H' zerlegt und der qualitative Nachweis fällt erst bei erheblich alkalischer Reaktion der Lösung negativ aus. (Untere Grenze bei 36° C und 6 Stunden Dauer bei 1×10^{-9} g H-Ionen L.)

Es kann daraus geschlossen werden, daß bereits im Magen zu einem beträchtlichen Teile und auch noch im Darms das Hexamethylentetramin in Ammoniak und freien Formaldehyd gespalten wird. Nächste dem Magensaft hat nur das Sekretionsprodukt der Nieren eine saure Reaktion. Deshalb folgert *Trendelenburg* (15) für die Praxis, daß die Leistungsfähigkeit des Hexamethylentetramins als Antiseptikum des lebenden Organismus auf die Möglichkeit einer Desinfektion des Blutes — bei saurer Reaktion des Harns — beschränkt ist. Darüber hinaus sind namentlich in neuerer Zeit immer wieder Stimmen laut geworden, die einer „innerdesinfektorischen“ Wirkung des Formaldehyds das Wort reden. Die Angaben erstrecken sich auf mehr oder

minder reiche Erfahrungen an akuten und chronischen Infektionen. Ob in diesen Fällen der therapeutische Effekt als erwiesen angesehen werden kann, muß offen bleiben. Es fragt sich aber, wie weit er aus den hier gewonnenen Ergebnissen und den in der Literatur bereits niedergelegten Erfahrungen möglich und für eine kritische Nachprüfung am klinischen Material geeignet erscheint.

Aus den Versuchen *Simons* ging hervor, daß beim Kaninchen intravenös injizierter Formaldehyd schnell aus dem Blute verschwindet. *Salkowski* (16) konnte nachweisen, daß nicht das Blutalkali dafür in Frage kommt, und nahm bereits unter anderen Möglichkeiten auch die einer Bindung an das Bluteiweiß an.

Aus meinen Versuchen ergibt sich nicht nur eine solche Bindung, sondern auch die intensivere Wirkung des Formaldehyds auf die leichter fällbaren Serumbestandteile, die sogenannten Globuline.

Wenn nun auch die akuten sowohl wie die chronischen Infektionen durch eine Verschiebung des Eiweißquotienten zugunsten der leichter fällbaren Globuline ausgezeichnet sind (Literatur bei *Naegeli*, I. c.) und somit der Formaldehydwirkung in vitro günstigere Bedingungen bieten, so ist daraus eine therapeutische Wirkung am Lebenden noch nicht erwiesen. Hier kann aber vielleicht ein Gesichtspunkt weiterhelfen, auf den früher bereits kurz hingewiesen wurde: Die zumeist für Lues charakteristischen Serumveränderungen, wie sie durch die *Wassermannsche* Reaktion angezeigt werden, kommen auch bisweilen bei anderen Infektionen zustande, ohne daß einluetischer Infekt vorgelegen hat. (Die hervorragende praktische Bedeutung der *Wassermannschen* Reaktion — das muß ausdrücklich betont werden — wird davon nicht berührt.) In letzter Zeit ist dies vereinzelt bei der Endocarditis lenta beschrieben (17), während die Erscheinung bei Karzinom, Scharlach und Malaria z. B. schon länger bekannt ist. Es muß auffallen, daß namentlich in den letzten beiden Fällen auch die Behandlung mit Salvarsan gute Erfolge und Schwinden der positiven *Wassermannschen* Reaktion zeitigen kann. Wie ist dies mit der chemisch-bakteriotropen Wirkung des Salvarsans zu erklären? Bei dem Scharlach hat man sich mit der Annahme zu helfen gesucht, daß die Heilwirkung über die Mundspirochäten erfolgen soll. (Vgl. *Matthes*, I. c., S. 79.) Bei der Malaria kennt man und sah ich selbst (18) auf einmalige hohe Salvarsandosens (0,6 bis 0,9!) Dauerheilung und im letzten Falle Negativwerden der vorher positiven *Wassermannschen* Reaktion. Hier kann eine Hilfshypothese wie beim Scharlach sicher nicht mehr herangezogen werden. Es darf deshalb in diesen Fällen vielleicht im Hinblick auf die Beeinflussung der *Wassermannschen* Reaktion an die Möglichkeit einer Einwirkung auf die labile Globulinfraction bzw. deren einzelne Komponenten gedacht werden. *Bircher* (19) konnte in Studien am Luesblut eine Abnahme des refraktoviskosimetrischen Quotienten bei gleichzeitiger Zunahme der Serumglobuline feststellen und sah bei der Syphilisbehandlung eine Tendenz zur Normierung. Der Autor fand ferner am Serum von Krebs- [vgl. hierzu auch *Loebner*, unter *Naegeli* (20)], Tuberkulose-, Aktinomykose- und Sarkomkranken gewöhnlich eine Globulinzunahme. Innerhalb gewisser Grenzen — auch diese Regel ist nicht ohne Ausnahme, vgl. besonders *Loebner* — ging eine Besserung mit Ab-, eine Verschlechterung mit Zunahme des Globulin-

gehalts im Serum einher. Vielleicht sind auch so die Ergebnisse erklärbar, die ich selbst bei Prüfung der Suspensionsstabilität des Blutes karzinomatöser Patientinnen vor und nach Röntgenbestrahlungen hatte und die größtenteils einen deutlichen Rückgang der vorher abnormen Instabilität zeigten.

Der therapeutische Effekt einer *unspezifischen Normierung des gestörten Eiweißquotienten*, wie er anscheinend auf verschiedenen Wegen erzielt werden kann, erscheint sonach auch für den Formaldehyd denkbar. Wenigstens lassen sich Erfolge bei Infektionen, speziell auch bei Malaria und Lues — Negativwerden der *Wassermannschen* Reaktion (21) —, in diesem Sinne deuten. Der Formaldehyd wird bei normalen Säureverhältnissen bereits im Magen zum größten Teil aus dem peroral gereichten Hexamethylen abgespalten (*Salkowski, Trendelenburg*) und von den Eiweißkörpern des Blutes, besonders aber den labileren Globulinen, gebunden und erst in der Niere wieder mehr oder minder vollständig ausgeschieden. Dabei fallen die möglicherweise veränderten Globuline als „blutfremd“ (*Abderhalden*) einem Abbau bzw. Umbau anheim.

Die Überprüfung dieser Folgerungen am klinischen Material wäre sonach von den Infektionen auszudehnen auf die vorerwähnten Zustände mit Verschiebung des Eiweißquotienten im Sinne einer Globulinvermehrung.

Zusammenfassung.

Der unter anderem in der ersten Mitteilung erhobene Befund einer Zustandsänderung der Serumeiweißkörper auf Formaldehydzusatz, die als Entquellung erkannt war, wird erweitert:

1. Globulinreiche Sera reagieren intensiver als globulinarme.
2. Lösungen von Albumin und Globulin zeigen ein verschiedenes Verhalten gegenüber Formaldehyd.
3. Der bei Halbsättigung mit kaltgesättigter neutraler Ammonsulfatlösung ausfallende Anteil menschlichen Serums wird durch zweistündiges Erhitzen im Thermostaten bei 60° C vermehrt.
4. Entsprechend dieser Vermehrung des durch Ammonsulfat leichter flockbaren Serumeiweißes steigt die innere Reibung des Gesamtserums.
5. Das vorbehandelte Serum zeigt gegenüber dem nicht behandelten eine unverhältnismäßig viel höhere Reaktionsfähigkeit auf Formaldehyd.
6. Diese Ergebnisse stehen in Parallele zu den Resultaten anderer Autoren, die ein graduell abgestuftes Verhalten der durch steigende Sättigung mit Ammonsulfat erhaltenen Serumfraktionen fanden, doch erscheint dabei
7. die Reaktion an den kolloiden Zustand gebunden, denn das Serumkoagel reagiert nicht mehr in dieser Weise auf Formaldehydzusatz.
8. Folgerungen für die Wirkungsmöglichkeit des Formaldehyds in vivo.

Literatur.

- 1) Kürten, diese Zeitschr. 133, 126, 1922. — 2) Gram, Journ. of biol. Chem. 49, 279, 1921. — 3) Moll, Hofmeisters Beitr. 4, 563, 1903. — 4) Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 207, 1902. — 5) Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 9. Aufl., 1922, S. 79. — 6) Abderhalden, ebendasselbst, 4. Aufl., Bd. 1, S. 417. — 7) Naegeli, Blutkrankheiten und Blutdiagnostik, 3. Aufl., 1919, S. 64. — 8) Hofmeister und Pohl, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 20, 426, 1886. — 9) Naegeli, l. c.; Rohrer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 121, 221, 1916; Schweizer med. Wochenschr. 1922, Nr. 22; Alder, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 126, 61, 1918. — 10) Obermayer und Willheim, diese Zeitschr. 88, 331, 1912; 50, 369, 1913. — 11) H. Schiff, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 29, II, 1354, 1896. — 12) Hanzlic und Collins, Arch. of intern. Med. 12, 578, 1913, zitiert nach Trendelenburg, l. c. — 13) Trendelenburg, diese Zeitschr. 95, 146, 1919. — 14) Kurt Voit, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 95, 124, 1922. — 15) Trendelenburg, Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 24. — 16) Salkowski, diese Zeitschr. 115, 159, 1921. — 17) Morawitz, Münch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 46; Gessler, Med. Klinik 1921, Nr. 49; Matthes, Lehrbuch der Differentialdiagnostik, 3. Aufl., 1922, S. 169. — 18) Kürten, Münch. med. Wochenschr. 1917, Nr. 26. — 19) Bircher, Journ. of Laborat. and clin. Med. 7, 660, 1922. — 20) Loebner, unter Naegeli, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 127, 397, 1918. — 21) Sachs, Wien. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 32.

**Studien über das Verhalten der wichtigsten Kohlehydrate
(Glucose, Galactose, Fructose, Mannose, Maltose, Lactose,
Saccharose) in stark saurer, alkalischer, sulfit- und bisulfit-
haltiger Lösung.**

I. Mitteilung.

Die Inversion der Lactose (Milchzucker) mit starken Säuren.

Von

B. Bleyer und H. Schmidt.

(Aus dem chemischen Laboratorium der wissenschaftlichen Zweigstelle
München der chemischen Fabriken Merck, Boehringer, Knoll.)

(Eingegangen am 27. November 1922.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

A. Einleitung.

Wird ein natürlicher Zucker (Fructose, Glucose, Mannose usw.) in Wasser gelöst und die Lösung im Polarimeterrohr beobachtet, so wird je nach dem asymmetrischen Aufbau des C-Skeletts der Strahl des polarisierten Lichtes mehr oder weniger aus seiner Richtung abgelenkt. Diese anfängliche Drehung bleibt aber in den seltensten Fällen konstant, sondern ist infolge Einstellung von bestimmten Gleichgewichtsgemengen verschiedener stereoisomerer Formen Änderungen unterworfen; dieser Erscheinung hat man die Bezeichnung „Mutarotation“ zugelegt.

Bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien auf Kohlehydrate sind noch zwei weitere Arten von Drehungsänderungen streng voneinander zu unterscheiden:

a) Primäre Drehungsänderungen, die nur in einer Verschiebung der Gleichgewichtsmenge der beiden stereoisomeren Formen zugunsten der einen oder anderen Modifikation beruhen und durch Aufheben der störenden Ursache mehr oder weniger vollständig rückgängig gemacht werden können. Veränderungen in diesem Sinne bewirken sehr verdünnte Alkalien, Säuren mittlerer Konzentration und auch einige Neutralsalze.

b) Sekundäre Drehungsänderungen (Inversion, Kondensation, Esterbildung), die erfolgen, wenn durch das Lösungsmittel chemische Reaktionen ausgelöst werden, die dann auch meist zu Verbindungen mit anderen Drehungsvermögen führen. Diese Drehungsänderungen sind naturgemäß

nicht ohne weiteres wieder rückgängig zu machen und werden durch *starke Säuren* und *Alkalien* hervorgerufen.

Die Glucose erfuhr in der Richtung der primären Drehungsänderungen die *gründlichste* Untersuchung. Von den sekundären Drehungsänderungen hat die Inversion der Saccharose hauptsächlich durch *Wilhelmy*, *Ostwald* und *Nernst* eine gründliche experimentelle und theoretische Bearbeitung erfahren. Starke Anomalien bei der spezifischen Drehung der Glucose haben zuerst *Willstätter* und *Daish* bei der Einwirkung von starker Salzsäure beobachtet.

Über die Inversion der Lactose ist bisher wenig bekannt geworden. Wir haben deshalb wegen der biochemischen Bedeutung des Abbaues der Lactose die Inversion zahlenmäßig mit Hilfe der Polarimetermethode durchgeführt.

B. Experimenteller Teil.

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß n , $2n$ und $3n$ Salzsäure auch bei tagelangem Einwirken bei Zimmertemperatur keine nennenswerte Wirkung auslöste, war die Zahl der in Frage kommenden Säuren von vornherein eine sehr beschränkte. Nur hohe Wasserstoffionenkonzentrationen konnten hier zum Ziele führen. Da aber starke Säuren nicht nur invertierend, sondern auch chemisch meist unter Zersetzung auf Lactose wirken, versuchten wir mit organischen Säuren unser Ziel zu erreichen. In den angewandten konzentrierten Lösungen von Monochlor-, Trichloressigsäure und Benzolsulfosäure ist aber Lactose nicht in dem Maße löslich, wie es für eine polarimetrische Untersuchung wegen der geringen Drehungsänderung notwendig ist. In konzentrierter Ameisensäure ist der Milchzucker zwar genügend löslich, es findet auch bei gewöhnlicher Temperatur eine langsame Drehungsänderung statt, doch lassen die Ergebnisse, im Hinblick auf Versuche von *Grossmann* und *Bloch*¹⁾ und auf eigene, im zweiten Teile dieser Abhandlung besprochene Versuche, keine einwandfreie Deutung zu. Nach diesen negativen Befunden waren wir einzig und allein auf anorganische Säuren angewiesen. Von diesen scheidet die Salpetersäure wegen ihrer oxydierenden Eigenschaften von vornherein aus. Die Inversion wurde schließlich mit starker Schwefelsäure, Überchlorsäure und Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur durchgeführt. Für vergleichende Versuche bei verschiedenen Temperaturen und Konzentrationen wurde nur die Salzsäure $s = 1,185$ und die Überchlorsäure $s = 1,67$ benutzt.

Die Versuchsanordnung ist bei allen Versuchen folgende:

In einem *Ostwaldschen* Thermostaten wurde durch einen selbsttätig regulierenden Mikrobrenner eine große Wassermenge auf konstanter Tempe-

¹⁾ Zeitschr. d. Ver. deutsch. Zuckerind. 1912, S. 19 bis 74.

ratur gehalten und mit Hilfe einer elektrisch betriebenen Zentrifugalpumpe in langsamem Strom durch den Mantel der Polarimeterröhre getrieben. Die Konstanz der Temperatur wurde durch zwei Thermometer, von denen sich eines im Thermostaten, das andere in der Versuchsflüssigkeit befand, ständig kontrolliert. Als Polarimeter diente ein Halbschattenapparat mit Kreisskala der Firma Schmidt & Haensch. Das Natriumlicht wurde in der üblichen Weise erzeugt. Als Kochsalzträger benutzten wir schmale Streifen von Eisendrahtnetz, die durch Eintauchen in geschmolzenes Kochsalz getränkt wurden. Das erzeugte Natriumlicht wurde noch durch eine vorgeschaltete Schicht von Kaliumdichromat gefiltert. Die Inversionssäure wurde im Thermostaten immer auf die jeweilige Versuchstemperatur vorgewärmt. Die Beobachtung wurde erst dann begonnen, nachdem die in die Polarisationsröhre eingefüllte Inversionsflüssigkeit die Versuchstemperatur angenommen hatte. Die Zeitmessung erfolgte ebenfalls erst von diesem Moment an. Sämtliche Versuche wurden in einer Polarisationsröhre von 2 dm Länge ausgeführt.

a) Die Inversion bei wechselnder Wasserstoffionenkonzentration.

1. Inversion der Lactose durch Anwendung von 22 n Schwefelsäure¹⁾.

Angewandte Substanz: 5 g in 100 ccm.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{\alpha}{\alpha-x}$	K
10	7,25	25,1	—	—
20	7,50	25,0	0,0348	0,0035
45	8,40	25,0	0,1897	0,0054
60	8,70	25,1	0,2636	0,0053
90	9,05	25,0	0,3575	0,0045
120	9,25	25,0	0,4220	0,0038
150	9,50	25,1	0,5119	0,0037
∞	10,50	25,0	—	—

K im Mittel 0,0044.

Die Konstanz der Zahlen in der fünften Kolonne ist wenig befriedigend. Die Abweichungen erklären sich durch Versuchsfehler, die wegen der geringen Änderung des Drehungswinkels sich stark geltend machen. Auffallend ist anormale Anfangsdrehung der Lactose. Nimmt man für die spezifische Drehung der Lactose den Wert 52,6° an, so müßte sich für die 5proz. Lösung eine Drehung von 5,26° ergeben, während der Wert 7,25° beobachtet wurde. Die Drehung müßte also in den ersten 10 Minuten von 5,26 auf 7,25° gestiegen sein, was aber in Anbetracht der geringen Drehungsänderung in den zweiten 10 Minuten nicht anzunehmen ist. In der Tat handelt es sich hier um eine Beeinflussung der Drehung durch die Schwefelsäure. Wir haben im zweiten Teil dieser Abhandlung eingehende Untersuchungen über die Änderungen der spezifischen Drehung der Kohlehydrate durch starke Säuren angestellt. Vorausschickend be-

¹⁾ Siehe Abb. 1 u. 2 der graphischen Darstellungen.

merken wir hier schon, daß die Drehung erheblich mit der Säurekonzentration steigt. Diese Wirkung haben alle konzentrierten Säuren.

Die Anwendung noch stärkerer Säurekonzentrationen zur Inversion hat sich als unzweckmäßig erwiesen, weil dann neben der Erhöhung des Anfangswerts noch sekundäre Drehungsänderungen eintreten.

Bei Anwendung von Schwefelsäure für die Inversion dürfte eine Säurekonzentration von 24 n die günstigste sein.

2. Inversion der Lactose durch Anwendung von 24 n Schwefelsäure¹⁾.

Angewendete Substanz: 5 g in 100 cem.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	7,60	25,0	—	—
20	8,20	25,2	0,0792	0,0079
30	8,80	25,1	0,1761	0,0088
45	9,30	25,0	0,2776	0,0079
60	9,75	24,9	0,3950	0,0079
90	10,30	25,0	0,6021	0,0075
120	10,60	25,0	0,7782	0,0071
∞	11,20	25,0	—	—

K im Mittel 0,0077.

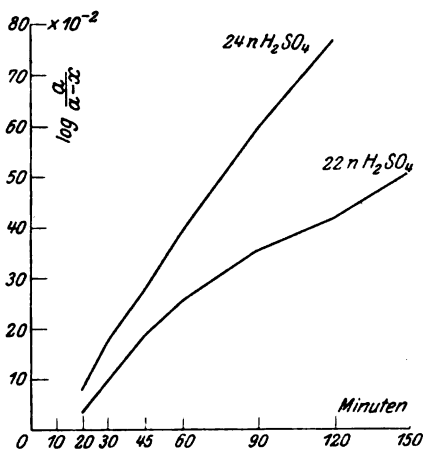


Abb. 1 u. 2. Verlauf der Lactose-Inversion bei Anwendung von 22 n H₂SO₄ und 24 n H₂SO₄.

b) Die Inversion bei wechselnder Temperatur.

Um eine Einwirkung der Säure auf die Lactose möglichst zu vermeiden, wurden für diese Versuche Salzsäure $s = 1,185$ und Überchlorsäure $s = 1,67$ verwendet. Desgleichen wurden, um größere Drehungsänderungen zu bekommen, nicht 5 g, sondern 8 g Substanz in 100 cem gelöst.

¹⁾ Siehe Abb. 1 u. 2 der graphischen Darstellungen.

1. Inversion der Lactose durch Anwendung von
Salzsäure $s = 1,185$ bei $15^{\circ 1)}$.

Angewandte Substanz: 8 g in 100 ccm.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	11,09	14,9	—	—
30	11,32	15,0	0,0220	0,0011
60	11,71	15,1	0,0618	0,0012
120	12,12	14,9	0,1073	0,0010
180	12,55	15,0	0,1616	0,0010
360	13,67	15,2	0,3451	0,0010
480	14,20	15,0	0,4694	0,0010
∞	15,80 ²⁾	—	—	—

K im Mittel 0,0011.

2. Inversion der Lactose durch Anwendung von
Salzsäure $s = 1,185$ bei $20^{\circ 1)}$.

Angewandte Substanz: 8 g in 100 ccm.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	11,25	20,1	—	—
20	11,45	20,1	0,0195	0,0020
45	12,00	20,0	0,0782	0,0022
60	12,20	20,0	0,1017	0,0020
90	12,75	20,0	0,1737	0,0022
120	13,20	20,0	0,2430	0,0022
150	13,45	20,0	0,2869	0,0021
∞	15,80 (berechnet)	—	—	—

K im Mittel 0,0021.

3. Inversion der Lactose durch Anwendung von
Salzsäure $s = 1,185$ bei $25^{\circ 1)}$.

Angewandte Substanz: 8 g in 100 ccm.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	11,30	24,8	—	—
20	11,75	25,1	0,0458	0,0046
30	12,09	25,1	0,0838	0,0042
45	12,60	25,0	0,1481	0,0042
60	13,00	24,9	0,2061	0,0041
75	13,50	24,9	0,2915	0,0045
90	13,70	25,2	0,3310	0,0041
120	14,30	25,1	0,4711	0,0043
∞	15,80 (berechnet)	—	—	—

K im Mittel 0,0043.

¹⁾ Siehe Abb. 3 der graphischen Darstellungen.

²⁾ Der Endwert $15,80^{\circ}$ wurde aus dem extrapolierten Anfangswert von $10,75^{\circ}$ durch Multiplikation mit 1,47 erhalten.

4. Inversion der Lactose durch Anwendung von Salzsäure $s = 1,185$ bei $30^{\circ 1}$).

Angewandte Substanz: 8 g in 100 cem.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	11,60	30,0	—	—
20	12,30	30,2	0,0792	0,0079
30	12,90	30,0	0,1609	0,0081
45	13,70	30,0	0,3010	0,0086
60	14,20	30,0	0,4191	0,0084
∞	15,80	—	—	—
(berechnet)				

K im Mittel 0,0082.

Bei diesem und den folgenden Versuchen wurde die Beobachtung unterbrochen, wenn die Lösung Gelbfärbung angenommen hatte.

5. Inversion der Lactose durch Anwendung von Salzsäure $s = 1,185$ bei $35^{\circ 1}$).

Angewandte Substanz: 8 g in 100 cem.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	12,32	35,0	—	—
15	12,90	35,1	0,0792	0,0158
20	13,45	35,0	0,1705	0,0171
25	13,90	35,0	0,2628	0,0175
30	14,25	35,0	0,3513	0,0176
41	14,77	35,0	0,5287	0,0171
50	15,07	35,0	0,6783	0,0170
60	15,35	35,0	0,8884	0,0178
∞	15,80	—	—	—
(berechnet)				

K im Mittel 0,0171.

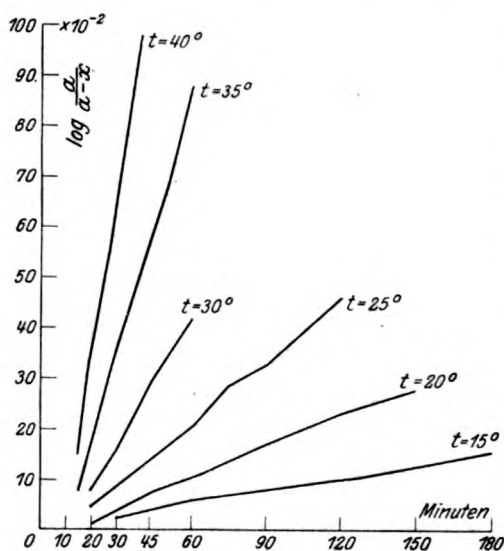
6. Inversion der Lactose durch Anwendung von Salzsäure $s = 1,185$ bei $40^{\circ 1}$).

Angewandte Substanz: 8 g in 100 cem.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
11	12,90	39,9	—	—
15	13,75	40,0	0,1507	0,0377
20	14,50	40,0	0,3485	0,0387
27	14,95	40,0	0,5330	0,0333
30	15,10	40,0	0,6173	0,0325
40	15,50	40,0	0,9853	0,0340
∞	15,80	—	—	—
(berechnet)				

K im Mittel 0,0352.

¹⁾ Siehe Abb. 3 der graphischen Darstellungen.



Für sehr zweckmäßig hat sich die Überchlorsäure $s = 1,67$ erwiesen. Die Inversion verläuft sehr rasch. Die Konstante K hat bei 25° den Wert $0,0513$, ist also ungefähr zehnmal größer als bei der Anwendung von Salzsäure $s = 1,185$. Die Inversion ist daher bereits abgelaufen, ehe nennenswerte Zersetzungen eingetreten sind.

Abb. 3. Verlauf der Lactose-Inversion bei Anwendung von ClH $s = 1,185$ bei verschiedenen Temperaturen.

7. Inversion der Lactose durch Anwendung von Überchlorsäure $s = 1,67$ bei 20°).

Angewandte Substanz: 8 g in 100 ccm.

Zeit Minuten	Winkel Grad	Temperatur $^\circ\text{C}$	$\log \frac{a}{a-x}$	K
10	14,17	19,8	—	—
16	16,00	19,9	0,1639	0,0273
22	17,08	20,0	0,3010	0,0251
30	18,00	20,0	0,4649	0,0232
40	18,67	20,0	0,6410	0,0213
∞	20,00	20,0	—	—

K im Mittel $0,0242$.

8. Inversion der Lactose durch Anwendung von Überchlorsäure $s = 1,67$ bei 25°).

Angewandte Substanz: 8 g in 100 ccm.

Zeit Minuten	Winkel		Temperatur $^\circ\text{C}$	$\log \frac{a}{a-x}$	K
	Grad	Min.			
3	13	30	24,8	—	—
5	14	50	24,9	0,0997	0,0500
10	17	20	25,0	0,3849	0,0551
15	18	25	25,0	0,6133	0,0511
20	19	00	25,0	0,8129	0,0478
30	19	35	25,0	1,1931	0,0442
∞	20	00	25,0	—	—

K im Mittel $0,0500$.

¹⁾ Siehe Abb. 4 der graphischen Darstellungen.

Ergebnis. Die Inversion der Lactose durch Salzsäure $s = 1,185$, 22n und 24n Schwefelsäure und Überschlorsäure $s = 1,67$ ist, wie vorstehende Tabellen und graphische Darstellungen zeigen, von der Wasserstoffionenkonzentration und in besonders hohem Grade von der Temperatur abhängig. Sie befolgt, im Gegensatz zu der durch Enzyme bewirkten Inversion, innerhalb der Versuchsfehler das Gesetz für monomolekulare Reaktionen. Nach einem von *van't Hoff* empirisch abgeleiteten Gesetz findet bei 10° Temperaturerhöhung gewöhnlich eine Verdoppelung bis Verdreifachung der Reaktionskonstanten statt. Bei der Inversion der Lactose vervierfacht sich die Konstante bei einer Temperaturerhöhung von 10° .

In Anbetracht der großen Beständigkeit der Lactose gegenüber Wasserstoffionen ist das Resultat überraschend. Die besten Versuchsbedingungen liegen bei einer Temperatur von 25 bis 30° , weil da die Inversion bereits praktisch beendet ist, ehe die durch Zersetzung der Lactose hervorgerufenen Drehungsänderungen maßgebend ins Gewicht fallen. Auch die Maltose kann mit Hilfe dieser Methode bei gewöhnlicher Temperatur invertiert werden.

Zur theoretischen Berechnung der Konstanten K bei verschiedenen Temperaturen wurde die *van't Hoff*sche Formel

$$b(t_2 - t_1) = \log K_2 - \log K_1$$

benutzt. Für die Inversion mit Salzsäure $s = 1,185$ ergeben sich folgende Werte¹⁾:

Temperatur °C	K beobachtet	K berechnet
15	0,0011	—
20	0,0021	0,0021
25	0,0043	0,0042
30	0,0082	0,0084
35	0,0171	0,0168
40	0,0353	0,0340

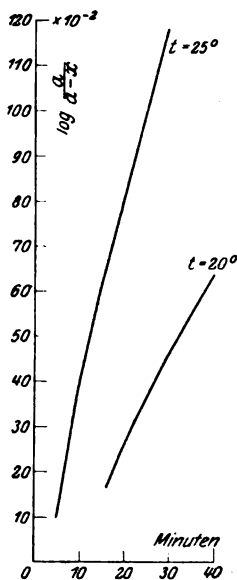


Abb. 4. Verlauf der Lactose-Inversion durch Anwendung von Überschlorsäure $s = 1,67$ bei 20° und 25° .

¹⁾ Die Änderung der Konstanten K mit der Temperatur und ihre Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration ist in der. Abb. 5 graphisch dargestellt.

Wie vorstehende Tabelle zeigt, stimmen die berechneten Werte von K innerhalb der Fehlergrenze mit den beobachteten Werten gut überein.

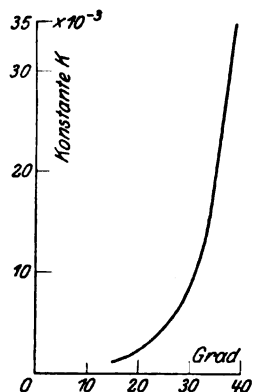


Abb. 5. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten K von der Temperatur.

c) Die Inversion der Lactose bei wechselnder Konzentration.

Alle Versuche wurden mit Salzsäure $s = 1,185$ bei 25° ausgeführt.

1. Angewandte Substanz: 4 g in 100 ccm¹).

Zeit Minuten	Winkel		Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
	Grad	Min.			
5	5	30	25,0	—	—
10	5	40	25,0	0,0322	0,0064
30	6	00	24,9	0,1047	0,0042
60	6	30	23,1	0,2430	0,0044
90	6	52	25,0	0,3827	0,0045
120	7	03	25,0	0,4740	0,0041
∞	7	50	25,0	—	—

K im Mittel 0,0051.

2. Angewandte Substanz: 8 g in 100 ccm¹).

Aus den Versuchen unter b), Ziffer 3 ergibt sich K im Mittel 0,0043.

3. Angewandte Substanz: 12 g in 100 ccm¹).

Zeit Minuten	Winkel		Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
	Grad	Min.			
5	16	08	25,3	—	—
10	16	33	25,0	0,0232	0,0046
35	17	40	25,1	0,0924	0,0030
60	18	40	25,0	0,1654	0,0030
90	19	30	25,1	0,2372	0,0028
120	20	30	25,1	0,3428	0,0030
∞	24	80	—	—	—

(berechnet)

K im Mittel 0,0034.

4. Angewandte Substanz: 20 g in 100 ccm¹).

Zeit Minuten	Winkel		Temperatur °C	$\log \frac{a}{a-x}$	K
	Grad	Min.			
5	26	30	25,2	—	—
10	26	50	25,2	0,0117	0,0023
30	27	35	25,0	0,0594	0,0015
60	28	30	25,0	0,0757	0,0013
90	29	30	25,0	0,1192	0,0014
120	30	00	25,1	0,1427	0,0012
300	34	00	25,1	0,3979	0,0014
∞	39	00	—	—	—

(berechnet)

K im Mittel 0,0015.

¹) Siehe Abb. 6 der graphischen Darstellungen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt also entgegen den Erwartungen mit steigender Konzentration der Lactose ab. Einen gesetzmäßigen Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen konnten wir nicht feststellen. Die Versuche lassen deshalb keine einwandfreie Deutung zu, weil bei diesen Säure- und Zuckerkonzentrationen nennenswerte Störungen durch Kondensation usw. eintreten. Vielleicht spielt der Quotient:

Lactosekonzentration

Wasserstoffionenkonzentration

der je nach der angewandten Lactosemenge ≤ 1 sein kann, eine ausschlaggebende Rolle.

Für die theoretische Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Temperaturen wird ausschließlich die *van 't Hoff*sche Formel benutzt. Es ist nun versucht worden, die Konstante K auf Grund einer anderen Formel theoretisch zu berechnen. Aus der graphischen Darstellung der Abhängigkeit derselben von der Temperatur ersieht man, daß die erhaltene Kurve eine Kurve wechselnder Ordnung ist und sich durch die Formel

$$K = a \cdot T^b \cdot \tau$$

darstellen läßt. Für verschiedene Temperaturen lautet dann die Formel

$$\log(K_2 - K_1) = b \cdot (T_2 \cdot \log T_2 - T_1 \cdot \log T_1).$$

Die Formel enthält also neben der Differenz der Temperaturen auch die Absolutwerte derselben. Die nach dieser Formel berechneten Werte sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Temperatur °C	K berechnet	K beobachtet
15	0,0011	0,0011
20	0,0021	0,0021
25	0,0043	0,0043 ¹⁾
30	0,0085	0,0082
35	0,0172	0,0171 ¹⁾
40	0,0339	0,0352

Die berechneten und beobachteten Werte stimmen also auch bei dieser Formel innerhalb der Fehlergrenzen überein.

¹⁾ Diese beiden Werte dienen zur Berechnung der Konstanten a und b .

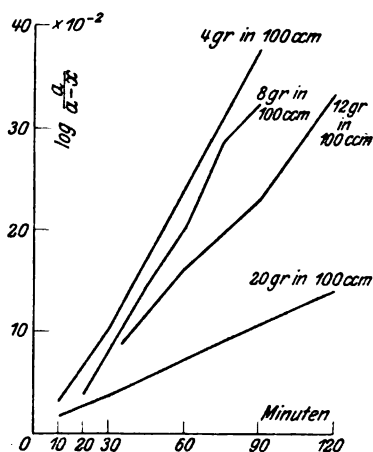


Abb. 6. Verlauf der Lactose-Inversion durch Anwendung von ClH $s = 1,185$ bei 25° und wechselnder Lactose-Konzentration.

Die geringe Beständigkeit des Rohrzuckers gegenüber Säuren ist vielleicht auf die größere Reaktionsfähigkeit des α -Oxydrings der Fructose zurückzuführen. Aus diesen Versuchen kann man aber noch einige biologisch wichtige Schlüsse ziehen. Auffallenderweise wird Lactose, die die größte Widerstandsfähigkeit gegen Säuren zeigt, schon von sehr verdünntem Alkali angegriffen und zu einfachen Bausteinen, meist bis zur Milchsäure, abgebaut. Kohlehydrate können also in vitro und sehr wahrscheinlich auch im Körper in zweifacher Weise in einfache Verbindungen zerlegt werden. Die dabei sich abspielenden Prozesse sind sehr verschiedener Natur. In saurer Lösung wird das Disaccharid zuerst invertiert. Die einzelnen Komponenten werden dann in einer bis jetzt noch nicht vollständig geklärten Weise weiter verarbeitet. Der Abbau in alkalischer Lösung geht dagegen ohne vorherige Inversion vom Disaccharid mit 12 Kohlenstoffatomen direkt zur Milchsäure mit drei Kohlenstoffatomen. Eine vorhergehende Spaltung ist bis jetzt experimentell noch nicht nachgewiesen worden. Sie ist auch nicht wahrscheinlich, da die entstehende Glucose größere Beständigkeit gegenüber Alkali wie die Lactose zeigt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch Willstätter¹⁾ beim Studium der Hefegärung. Er findet, daß ein Teil des Zuckers ohne vorherige Spaltung direkt von der Hefe vergoren wird. Es hat nun sicher einen tieferen Grund, daß in der Milch dieser von der Natur für die Nachkommenschaft bereitgestellten Nährflüssigkeit, der Milchzucker immer in bestimmter Menge enthalten ist. Durch die geringe Wasserstoffionenkonzentration der Magensäure kann, nachdem spezifische, Lactose spaltende Fermente im Magen zu fehlen scheinen, nicht verändert werden. Ein Abbau kann erst im alkalisch reagierenden Darm, wahrscheinlich unter Mithilfe von Fermenten, erfolgen. Wir halten daher die Annahme für nicht zu gewagt, daß der alkalische, also der direkte Abbau der Kohlehydrate im Stoffkreislauf des menschlichen Körpers eine größere Rolle spielt, als der Abbau in saurer Lösung und daß dasjenige Kohlehydrat, das diesem Abbau am leichtesten unterliegt, ernährungsphysiologisch eine bevorzugte Stellung einnimmt. Es wäre unter den vorstehenden Voraussetzungen auch interessant, erneut und eingehend zu untersuchen, wie sich die Lactose wegen ihrer größeren Säurebeständigkeit bei der Ernährung der Diabetiker verhält.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 118, 168; 115, 211.

Beiträge zu den Oxydationsvorgängen am Kohlemodell.

Von

O. Meyerhof und H. Weber.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 1. Dezember 1922.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Inhaltsangabe.

I. Die Selbstoxydation der Kohle in alkalischer Lösung	560
II. Die Selbstoxydation der Kohle: eine Oberflächenkatalyse . .	563
III. Die Bedeutung der OH'-Adsorption und der Kationen für die Oxydationsgröße	565
IV. Orientierende Versuche über die Oxydation organischer Sub- stanzen an Kohle	573

Die Untersuchungen *O. Warburgs*¹⁾ über die Verbrennung der Aminosäuren an Blutkohle (*Mercks Carbo medicinalis*) haben so genaue Analogien dieses Oxydationsvorgangs mit den Atmungsprozessen in lebenden Zellen ergeben, daß dies unmöglich auf einer bloß zufälligen Übereinstimmung beruhen kann. Wir nehmen vielmehr mit *O. Warburg* an, daß es sich hier um eine ursächliche Beziehung handelt, indem die Aminosäuren deshalb an Tierkohle in einer sehr ähnlichen Weise und zu denselben Endprodukten (CO_2 , NH_3 , H_2SO_4) wie im Tierkörper oxydiert werden, weil der Mechanismus in beiden Fällen in wesentlichen Punkten übereinstimmt. Es handelt sich nach *Warburg* um eine Oxydationskatalyse an Oberflächen, die schwermetallhaltig (Fe) sind.

Aus diesem Grunde haben wir uns zunächst allgemein die Frage vorgelegt, ob die Aminosäuren eine besondere Stellung der Kohlenoberfläche gegenüber einnehmen, oder ob es auch gelingt, andere Nährstoffe, insbesondere Kohlehydrate und Fettsäuren an Tierkohle zu oxydieren. Wir können gleich hervorheben, daß in der Tat, soweit wir bisher festgestellt haben, mindestens in quantitativer Beziehung den Aminosäuren eine ganz bevorzugte Stellung zukommt, und daß bei gleicher Adsorbierbarkeit Fettsäuren, Dicarbonsäuren, Oxyssäuren nur äußerst geringfügig, Zucker so gut wie gar nicht oxydiert werden. Geringere Oxydationen, soweit sie physiologisch interessant sind, werden im Schlußteil dieser Arbeit angeführt.

¹⁾ Diese Zeitschr. 113, 257, 1921; 119, 134, 1921.

Bei Versuchen, Kohlehydrate in schwach alkalischer Lösung an Tierkohle zur Oxydation zu bringen, wurden wir auf eine eigentümliche Selbstoxydation der Tierkohle in alkalischer Lösung aufmerksam. Da dieser Vorgang eine interessante Gesetzmäßigkeit erkennen ließ, und sich ebenfalls als eine typische Oberflächenkatalyse herausstellte, haben wir ihn hier näher untersucht, um einen weiteren Einblick in die chemischen Vorgänge zu erhalten, die sich in der Adsorptionsschicht der Kohle abspielen. Obendrein bot auch dieser Prozeß gewisse Analogien zu physiologischen Oxydationsvorgängen.

Daß bei der Aufnahme von Sauerstoff durch fein verteilte Kohle diese unter gewissen Umständen der Selbstoxydation unterliegen kann, ist schon von verschiedenen Autoren beobachtet. Allerdings handelt es sich dabei meist nicht um in wässriger Lösung suspendierte Kohle. *Baker*¹⁾ fand z. B., daß Tierkohle, die feuchten Sauerstoff aufgenommen hatte, diesen beim Auspumpen bei 100° größtenteils als CO₂ abgab, nicht dagegen bei tiefer Temperatur, wo der Sauerstoff unverändert abgegeben wurde. Ebenso gibt die Kohle nach *Smith* und *Reichard*²⁾ beim Kochen in Wasser den aufgenommenen Sauerstoff als Kohlensäure ab. Besonders bemerkenswert ist ferner die Feststellung von *Wöhler*³⁾, daß gewöhnliche, stark adsorbierbare Holzkohle an sich meist nicht mit flüssigem Sauerstoff explodiert, auch nicht nach Übergießen mit Eisensalz, wohl aber wenn sie mit diesem getränkt und dann geglüht wurde. Es ist dies dasselbe Verfahren, durch das es *Warburg* gelang, aus Benzoesäure hergestellte Kohle zur Oxydation von Aminosäuren zu befähigen⁴⁾. Schließlich wird von *Franz Fischer*⁵⁾ angegeben, daß Braunkohle und Lignin in schwacher Alkalilauge bei Zimmertemperatur an der Luft oxydiert würden und dabei in unlösliche Produkte übergingen.

Methodik. Die allgemeine Methodik stimmte mit der von *Warburg* verwandten überein. Benutzt wurde Carbo animalis, hochwertig biologisch geprüft. Die Oxydationsmessungen nach der Methode *Warburg-Siebeck* fanden im Thermostaten von 38° statt. Das Volumen des Gasraums der Oxydationsgefäße betrug etwa 12 ccm. Die meisten Messungen wurden in Luft vorgenommen, einige wenige in reinem Sauerstoff (s. unten). Zumeist wurde 0,05 g Kohle auf 2 ccm wässriger Lösung verwandt, in einzelnen Fällen 0,1 g. Die Kohle wurde vor Einfüllen in die Gefäße mit der wässrigen Lösung geschüttelt, um ein Adsorptionsgleichgewicht mit den in der Flüssigkeit gelösten Gasen herzustellen. Unter diesen Umständen zeigt die Kohle, in reinem Wasser und neutraler Lösung suspendiert, nur

1) Journ. Chem. Soc. 51, 249, 1887.

2) Zeitschr. f. angew. Chem. 81, 192, 1921.

3) Ann. d. Chem., Suppl. 2, 262; Chem. Zentralbl. 1866, S. 753; zitiert nach *Engler-Weissberg*, Vorgänge der Autoxydation, S. 71. Braunschweig 1904.

4) Diese Zeitschr. 119, 149, 1921.

5) Naturwissenschaften 9, 958, 1921.

eine ganz geringfügige Sauerstoffaufnahme, die bei verschiedenen Präparaten verschieden groß ist, häufig kaum meßbar und höchstens 2 bis 3 cmm O_2 pro 1 Stunde bei den hier verwandten Mengenverhältnissen beträgt.

Die Kohlensäure wurde ebenfalls nach der *Warburgschen* Methode im *Barcroftmanometer* bestimmt, durch Austreibung mit Phosphorsäure oder Salzsäure. Bei der Berechnung wurde für das gelöste CO_2 eine Korrektur angebracht¹⁾. Diese Methode ist hier nicht ganz genau, weil beim Ansäuern der Kohle eine gewisse Menge Sauerstoff aufgenommen wird, so daß der durch die Kohlensäureaustreibung entstandene positive Druck in den ersten Minuten ziemlich rasch sinkt. Wird aber in der Vorkontrolle und in der Schlußbestimmung genau gleich verfahren, so fällt dieser Fehler fast ganz heraus²⁾. Qualitativ erhielten wir übrigens dieselben Resultate mit der *Warburgschen* Barytmethode. Zu quantitativen Bestimmungen haben wir sie nicht benutzt, weil sich wegen des hohen Kohlensäuregehalts der Natronlauge und der langen Austreibungszeit gewisse Schwierigkeiten ergaben.

Für Adsorptionsmessungen wurde eine größere Menge Kohle in einer entsprechend größeren Flüssigkeitsmenge suspendiert, nach mehrfachem Aufschütteln mehrere Stunden lang absitzen gelassen und dann die abgeheberte, nur schwach getrübe Lösung titriert. Wir überzeugten uns, daß weder für die Messung der OH-Adsorption noch die der untersuchten Narkotika die geringe Trübung der Lösung, die von feinem Kohlenstaub herrührt, einen Fehler verursacht. Ebenso wurde sorgfältig darauf geachtet, Fehler durch Luftkohlensäure zu vermeiden, indem beim Umfüllen alle Lösungen so kurz wie möglich der freien Luft exponiert wurden. Auch wurde die Größe der hierbei möglichen Ungenauigkeit durch Kontrollen ermittelt.

I. Die Selbstoxydation der Kohle in alkalischer Lösung.

In verdünnter Natronlauge suspendierte Tierkohle nimmt beim Schütteln mit Luft bei 38° kontinuierlich Sauerstoff auf. Die Sauerstoffaufnahme wächst mit zunehmender OH'-Konzentration, wenn auch nicht proportional mit ihr. (Genauer s. Kapitel 3.) Die Gesamtmenge des aufgenommenen Sauerstoffs kann sehr beträchlich sein. Wenn auch die Geschwindigkeit der Reaktion allmählich nachläßt, so ist sie jedenfalls in 8 Stunden noch nicht beendet, längere Versuche haben wir nicht gemacht. Manche Kohlenpräparate verbrauchen pro 0,1 g in $n/2$ NaOH in 4 Stunden 400 cmm O_2 und mehr. Die Menge des aufgenommenen Sauerstoffs und die Geschwindigkeit der Oxydation ist in den verschiedenen Präparaten sehr verschieden. Ältere, in Glasgefäßen gelieferte Kohle nahm sehr viel mehr Sauerstoff auf als die später bezogene in Kartonverpackung, während die Geschwindigkeit der Aminosäureoxydation bei beiden nicht sehr verschieden war. Es ist hier also ein anderer Faktor im Spiel und weitere Beobachtungen gestatten den Schluß, daß die Größe der Sauerstoffaufnahme unter

¹⁾ Siehe z. B. O. Meyerhof, Pflügers Arch. 169, 117, 1917.

²⁾ Nach Warburg (diese Zeitschr. 113, 261, 1921) bleiben außerdem einige Prozente der gebildeten Kohlensäure an der Kohle adsorbiert, was eine weitere Ungenauigkeit darstellt.

anderem abhängt von dem Vorrat an oxydablen Kohlenstoffverbindungen, die an der Kohleoberfläche adsorbiert sind. Dieser Vorrat variiert offenbar nicht nur mit der Herstellungsart der Kohle, sondern vermutlich auch mit ihrer Aufbewahrung, indem bei Zutritt von feuchter Luft diese Stoffe schon vorher spontan oxydiert sein können.

Beispiele:

a) 0,1 g Kohle aus Glasgefäß, $n/5$ NaOH in 100 % O_2 in der ersten Stunde 84 cmm O_2 , im ganzen in $8\frac{1}{2}$ Stunden 387 cmm O_2 .

b) 0,1 g desselben Kohlenpräparats, $n/2$ NaOH in 100 % O_2 nach 4 Stunden 380 cmm O_2 .

c) 0,1 g Kohle aus Glasgefäß, $n/2$ NaOH, in $1\frac{1}{2}$ Stunden 188 cmm O_2 .
Leucinoxydation 165 cmm O_2 .

0,1 g Kohle aus Pappkarton, $n/2$ NaOH, in $1\frac{1}{2}$ Stunden 69 cmm O_2 .
Leucinoxydation 167 cmm O_2 .

Daß es sich bei dieser Sauerstoffaufnahme tatsächlich um eine Verbrennung handelt, wird bewiesen 1. durch den Vergleich der Gaszehrung in Sauerstoff, Luft und Stickstoff, 2. durch die gleichzeitige Kohlensäurebildung, 3. durch die Wärmetönung des Prozesses, 4. durch den Temperaturkoeffizienten.

Während, wie sich aus obigem Beispiel ergibt, in Luft pro 1 Stunde 30 Minuten 70 bis 130 cmm O_2 verbraucht werden, findet man nach längerer Durchspülung der Gefäße mit Stickstoff nur eine unbedeutende Gaszehrung, die in derselben Zeit 3 bis 8 cmm beträgt. Diese ist wohl auch auf methodische Ungenauigkeiten zu beziehen, nämlich den Gehalt des käuflichen Stickstoffs an Kohlensäure, die bei nachträglicher Absorption in der Natronlauge zu negativem Druck Anlaß gibt. Jedenfalls kommt diese Gaszehrung gegen den Sauerstoffverbrauch der luftgesättigten Kohlesuspension nicht in Betracht.

Die Oxydationsgeschwindigkeit der Anfangszeit ist in Sauerstoff gegenüber Luft durchschnittlich um 60 % gesteigert. Daß es sich hier um wirkliche Abhängigkeit vom Sauerstoffdruck und nicht etwa nur um eine bessere Sauerstoffversorgung handelt, geht daraus hervor, daß die Verringerung der Kohlenmenge die Oxydationsgeschwindigkeit pro Gewichtseinheit nicht vermehrt.

Beispiele: a) Sauerstoffverbrauch in 1 Stunde in $n/2$ NaOH.

1. 0,025 g Kohle in 20 % O_2 . . . 25 cmm O_2

2. 0,05 g „ „ 20 % „ . . . 51 „ „

3. 0,05 g „ „ 100 % „ . . . 85 „ „

b) 0,1 g Kohle in 4 Stunden in $n/2$ NaOH in 20 % O_2 254 cmm O_2 ,
in 100 % O_2 380 cmm O_2 .

2. Entsprechend dem Sauerstoffverbrauch wird Kohlensäure gebildet. Das Verhältnis (RQ) ist bei verschiedenen Kohlepräparaten nicht ganz gleich und scheinbar ist der Quotient bei den stärker sauerstoffzehrenden Kohlepräparaten größer; aber in allen Fällen ist er zwischen 0,5 und 1 gelegen.

Beispiele: *Tabelle I.*

	Kohle- menge g	n Na OH	Zeit	cmm O ₂	cmm CO ₂	RQ
Stark oxydierende Kohle . . .	0,15	0,2	2h 40'	151	150	1
	0,1	0,5	4	322	218	0,7
	0,1	0,5	4	256	215	0,85
	0,05	0,4	3	112	93	0,85
Schwach oxydierende Kohle . .	0,1	0,25	3	85	42	0,5
	0,05	0,5	3	73	50	0,7

3. Die Wärmebildung wurde in der von dem einen von uns beschriebenen Anordnung gemessen¹⁾, und zwar wurde das Kalorimeter während der Meßperiode dauernd von Sauerstoff durchströmt, was zugleich zum Aufwirbeln der Kohle diente. Entsprechend wurde auch der Vergleichsversuch der Gaszehrung mit Sauerstoffsättigung gemacht. Die Wärmetönung stimmte der Größenordnung nach mit der Verbrennungswärme von Fetten oder Kohlehydraten überein. Während pro 1 ccm O₂ bei Kohlehydratverbrennung 5 cal., bei Fettverbrennung 4,6 cal. gebildet werden, ergab sich hier gegen 4 cal. (zwischen 3,5 und 4,0 cal.). Die etwas geringere Wärmebildung ist möglicherweise auf ungenügende Sauerstoffsättigung in den Kalorimetergefäßen zu beziehen, da im allgemeinen die Wärme pro Gewichtseinheit Kohle bei geringeren Mengen etwas größer war. Auf jeden Fall haben wir es mit einem typischen Oxydationsvorgang organischer Moleküle zu tun.

Die Versuche der Tabelle II wurden im Thermostaten bei 22° angestellt, weil die Wärmemessungen bei 38° leicht fehlerhaft ausfallen.

Tabelle II.

Nr.	Zeit	n Na OH ccm	Sauerstoffversuch				Wärmeversuch				R Q
			Koble g	Flüss. ccm	O ₂ cmm	Koble g	Flüss. ccm	g-cal.	g-cal. pro 1 g		
1	1 h 30'	0,52	0,1	1,5	67	15	220	35	2,34	3,5	
2	1 30	0,52	0,1	2,3	64	10	220	25,7	2,57	4,0	
3	1 40	0,46	0,05	1,1	40	10	220	26,3	2,63	3,8	
		0,46	0,05	1,1	31						

4. Der Temperaturkoeffizient von Adsorptionskatalysen kann bekanntlich in weiten Grenzen schwanken. In extremen Fällen ist er entweder sehr klein, nur wenig über 1 (pro 10°), wenn die Diffusion der begrenzende Faktor für die Reaktionsgeschwindigkeit ist; oder aber er ist so groß wie ein chemischer Koeffizient, 2 oder darüber, wenn die Geschwindigkeit allein durch die chemische Reaktion im Adsorptionsraum bestimmt wird²⁾. Häufig indes liegen kompliziertere Verhältnisse vor.

¹⁾ O. Meyerhof, diese Zeitschr. 85, 246, 1911; Pflügers Arch. 146, 149.

²⁾ Siehe Freundlich, Kapillarchemie, 2. Aufl., 1922, S. 187 ff.

Mit einem solchen Fall scheinen wir es hier zu tun zu haben. Der Temperaturkoeffizient beträgt etwa $1,75$ pro 10^0 .

Beispiele:

Tabelle III.

Nr.	n Na OH	Kohle g	Zeit	Tiefe Tempe- ratur	O ₂ cmm	Hohe Tempe- ratur	O ₂ cmm	K ₁₀ ¹⁾
1	0,46	0,05	1h 30'	22,5°	18,5	38,8°	44,5	1,70
2	0,46	0,05	1	22,5	22,5	38,8	56	1,76
3	0,1	0,1	3	18,8	34	37,8	94	1,80

Es erschien nun möglich, daß der für eine chemische Reaktion etwas kleine Temperaturkoeffizient daher rührt, daß die OH-Ionen bei 38^0 geringer adsorbiert würden als bei 20^0 . Dies ist jedoch nicht der Fall. Innerhalb der Fehlergenauigkeit ist die Adsorption von OH', wie

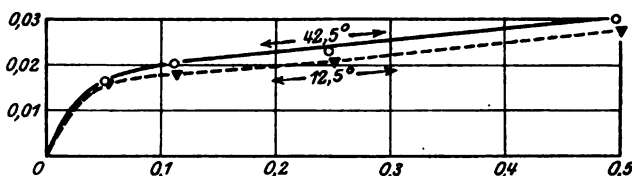


Abb. 1. Temperaturkoeffizient der Adsorption. Ordinate: adsorbierte Millimol OH'. Abszisse: Gleichgewichtskonzentration OH' in Millimol.

wir feststellten, bei den Temperaturen von 42^0 und 12^0 gleich, allenfalls bei der höheren Temperatur etwas größer (s. Abb. 1). Dieser Umstand berechtigt auch dazu, die bei Zimmertemperatur bestimmte Adsorption direkt mit den bei 38^0 gemessenen Oxydationsgrößen zu vergleichen.

II. Die Selbstoxydation der Kohle: eine Oberflächenkatalyse.

Der hier beschriebene Oxydationsvorgang gewinnt sein Interesse für uns dadurch, daß es sich um eine Adsorptionskatalyse handelt. An sich könnten ja die teerartigen Produkte oder ähnliche Verbindungen, die bei der Verkohlung des Blutes entstehen, auch in der alkalischen Lösung oxydiert werden. Daß der Vorgang indes an der Oberfläche verläuft, folgt auf Grund des von Warburg eingeführten Kriteriums, indem die Oxydation durch Narkotika in den typischen Konzentrationen entsprechend der Traubeschen Regel gehemmt wird. Wir haben dies für mehrere Urethane genauer untersucht. Die Gleichgewichtskonzentration der Urethane und die adsorbierten Mengen haben wir in einzelnen Fällen stalagmometrisch ermittelt, indem zunächst für

¹⁾ Berechnet nach der Formel: $K_{10} = \left(\frac{a_1}{a}\right)^{10}$, wo a die Oxydation bei der Temperatur t , a_1 bei der Temperatur $t + 10$ bedeutet.

verschiedene Narkotikakonzentrationen die Tropfenzahl mit dem Stalagmometer festgestellt, und dann die Tropfenzahl der von der

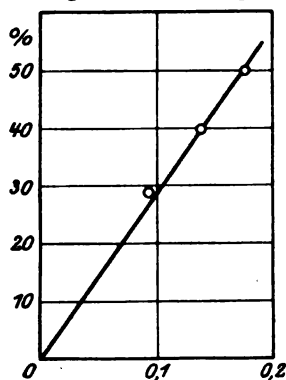


Abb. 2. Oxydationshemmung als Funktion der adsorbierten Menge Isobutylurethan.
Ordinate: prozentische Hemmung.
Abszisse: adsorbierte Millimol Isobutylurethan.

Kohle abfiltrierten Lösung in die gefundene Kurve eingezeichnet wurde. So wurde für drei Konzentrationen von Isobutylurethan Gleichgewichtskonzentration und adsorbierte Menge bestimmt und mit der Oxydationshemmung verglichen. Es ergab sich genau wie in den Versuchen Warburgs eine direkte Proportionalität zwischen beiden Größen (s. Abb. 2).

Bei Äthylurethan und Propylurethan haben wir die Gleichgewichtskonzentration gleich der zugesetzten Menge angenommen, was jedenfalls für das erstere keinen Fehler bedeutet, da die Verringerung der Konzentration stalagmometrisch nicht zu bestimmen war.

Tabelle IV.

	Ausgangslösung mol	Gleichgewichtslösung mol	Adsorbierte Millimol (für 2 ccm)	Hemmung %
Isobutylurethan	0,049	0,004	0,09	28
„	0,075	0,01	0,13	39
„	0,11	0,022	0,176	50
Äthylurethan	0,25	0,25	—	45
„	0,4	0,4	—	56
Propylurethan	0,05	—	—	37
„	0,2	—	—	54
„	0,5	—	—	75
Phenylurethan	—	0,000375	—	30
„	—	0,002	—	68

Die Oxydationshemmung mit Phenylurethan wurde ermittelt, indem die Kohle 5mal mit bestimmten Phenylurethanlösungen in der Zentrifuge gewaschen wurde.

50 % Hemmung wurde demnach erzielt durch etwa

Äthylurethan 0,25 mol
Propylurethan 0,1 mol
Isobutylurethan 0,022 mol
Phenylurethan 0,001 mol

Es erschien möglich, daß die Narkotika nicht den oxydablen Stoff, sondern das OH' von der Kohleoberfläche verdrängen, da, wie wir im nächsten Kapitel sehen werden, die Oxydationsgeschwindigkeit der adsorbierten OH-Menge genau proportional ist. Dies ist jedoch nicht der Fall und war schon nach den Versuchen von Michaelis und

*Rona*¹⁾ und dem von diesen Autoren aufgestellten „Verdrängungsgesetz“ unwahrscheinlich. Auf Grund dieses Gesetzes werden nämlich die polaren Verbindungen unabhängig von den oberflächenaktiven Stoffen adsorbiert und eine ausgesprochene Verdrängung findet nur innerhalb Gruppe statt. In der Tat wurde die Adsorption von jeder OH' durch m/2 Äthylurethan, welches gut 50 % hemmt, gar nicht verringert. Beispiel:

0,48 n NaOH Anfangskonzentration ergibt nach Adsorption 0,435 n Endkonzentration und 0,045 adsorbierte Millimol OH'. Die gleiche Anfangskonzentration gibt mit m/2 Äthylurethan 0,434 Endkonzentration und 0,046 adsorbierte Millimol OH'.

Während die Selbstoxydation der Kohle sich also gegenüber den Narkotika genau verhält wie die Oxydation von Aminosäuren und Oxalsäure, ist dies gegenüber Blausäure nicht der Fall. Erst n/100 KCN Lösung hemmt etwa 50 %, eine n/1000 Lösung ist vollständig unwirksam. In höheren Konzentrationen als n/100 verbrennt aber die Blausäure selbst mit merklicher Geschwindigkeit. Doch kann man diese schwache Beeinflußbarkeit durch Blausäure nicht als einen strikten Gegenbeweis dafür ansehen, daß es sich in unserem Falle um eine Schwermetallkatalyse an der Kohle handelt, wie bei der Oxydation der Aminosäuren. Nicht allein, daß in der alkalischen Lösung die hydrolytische Spaltung der KCN weitgehend zurückgedrängt ist, kann dies in noch höherem Grade an der Oberfläche durch die adsorbierten OH-Ionen geschehen.

III. Die Bedeutung der OH'-Adsorption und der Kationen für die Oxydationsgröße.

Nach *Michaelis* und *Rona*²⁾ hängt die Adsorption der OH' im weiten Maße von den gleichzeitig anwesenden Kationen ab. Die Autoren erklären dies Verhalten sehr anschaulich damit, daß die OH', als im allgemeinen leichter adsorbierbare Ionen, die Kationen vermittelt des elektrostatischen Zuges an die Oberfläche heranschleppen müssen und daher bei Anwesenheit leichter adsorbierbarer Kationen auch selbst stärker adsorbiert würden. Nun sind die Erdalkalisalze besser adsorbierbar als die Alkalisalze; noch besser aber die Schwermetallsalze, wobei die Adsorbierbarkeit mit dem Edelgrad des Metalls steigt. Entsprechend verhalten sich daher die Hydroxyde. Unsere Messungen bestätigen den Befund der genannten Autoren und ergeben folgendes: Die Oxydationsgröße beträgt bei gegebener OH'-Konzentration der Lösung um so mehr, je stärker adsorbierbar das betreffende Hydroxyd ist. Die quantitative Verfolgung dieser Feststellung aber führt zu dem interessanten Resultat, daß die Oxydationsgröße genau proportional ist der adsorbierten Menge OH', ganz unabhängig von der OH'-Konzentration der Lösung.

¹⁾ Diese Zeitschr. 16, 489, 1909; s. auch 94, 252, 1919; Kolloidzeitschr. 1922, S. 252. — ²⁾ Diese Zeitschr. 97, 85, 1919.

An erster Stelle wurde das Verhalten der Erdalkalihydroxyde $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und $\text{Ba}(\text{OH})_2$ untersucht. Qualitativ geht die starke Wirkung des Erdalkalis auf die Oxydationsgeschwindigkeit daraus hervor, daß der Zusatz von CaCl_2 zu der Kohlensuspension in NaOH die Oxydationsgröße erhöht, obwohl wegen der Schwerlöslichkeit des $\text{Ca}(\text{OH})_2$ die OH' -Konzentration bedeutend herabgesetzt wird. Quantitativ ergibt sich das Resultat, das in den folgenden Kurven dargestellt ist. Abb. 3a

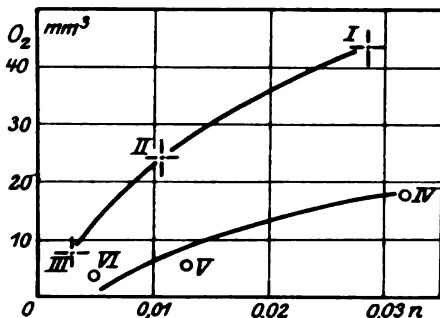


Abb. 3a.

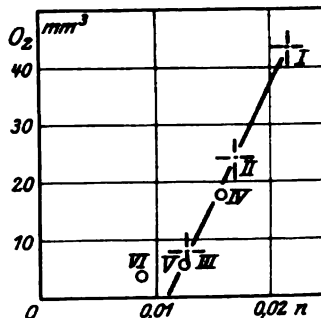


Abb. 3b.

Oxydationsgröße in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - und NaOH -Lösungen.

Abb. 3a. Atmungsgröße als Funktion der Gleichgewichtskonzentration.

Abb. 3b. Oxydationsgröße als Funktion der adsorbierten OH -Menge (in Millimol). Zweistündige Oxydation. Ordinate: cmm O_2 . Abszisse: Milliäquivalent OH' . (Die römischen Nummern stimmen mit denen der Tabelle V überein.) $\circ$ = $\text{Ca}(\text{OH})_2$. $\circ$ = NaOH .

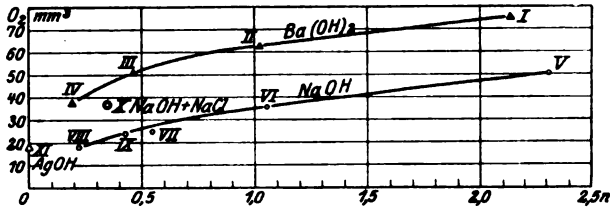
und b enthält den Vergleich der Oxydationsgeschwindigkeit in NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Die Oxydationsgröße ist als Ordinate, die OH' -Konzentration als Abszisse eingezeichnet. Wird der Sauerstoffverbrauch bezogen auf die Gleichgewichtskonzentration in der Lösung (Abb. 3a), so bekommt man zwei getrennte Kurven für NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$, die letztere erheblich rascher ansteigend. Wird die Oxydationsgröße dagegen verglichen mit der adsorbierten OH -Menge (Abb. 3b), so liegen alle Werte gemeinsam auf einer ansteigenden Geraden (die Oxydationsmessung von VI ist wegen des kleinen Wertes ungenau).

Tabelle V. O_2 in 2 Stunden pro 0,05 g.

Lösung Nr.	Stoff	n OH' vor Adsorption	n OH' nach Adsorption	Adsorbierte Millimol pro 2 ccm	O_2 in 2 h pro 0,05 g Kohle
I	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,0392	0,0285	0,0214	43,5
II	"	0,0192	0,0107	0,0170	24,5
III	"	0,0094	0,0030	0,0178	8
IV	NaOH	0,0398	0,0320	0,0156	18
V	"	0,0194	0,0131	0,0126	6
VI	"	0,0092	0,0048	0,0088	4

Noch genauer ergibt sich das gleiche aus einer anderen Versuchsserie, bei der eine größere Anzahl von Konzentrationen von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und NaOH in einem Doppelversuch miteinander verglichen wurden

(s. Abb. 4a und b). Wieder ist auf der Abb. 4a die Oxydationsgröße als Funktion der Gleichgewichtskonzentration, auf der Abb. 4b als



Oxydationsgröße und OH'-Konzentration in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und NaOH .

Abb. 4a. Atmungsgröße als Funktion der Gleichgewichtskonzentration.

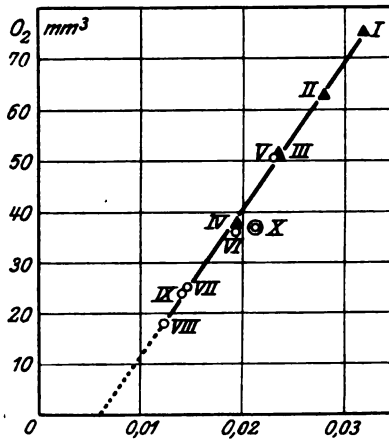
▲ I–IV = $\text{Ba}(\text{OH})_2$, ○ V–IX = NaOH , ⊗ X = $\text{NaOH} + \text{NaCl}$.

Die römischen Nummern stimmen mit Tabelle VI überein.

Funktion der adsorbierten Millimolzahl OH' eingetragen (über Punkt X und XI s. weiter unten). Das Zusammenfallen der Werte für $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und NaOH auf der Geraden ist in diesem Falle vollständig.

Schließlich sind die Adsorptionsmessungen von $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und NaOH nach *Freundlich* in das logarithmische Netz eingezeichnet (Abb. 5). Es ergeben sich gerade Linien, und zwar fallen die Geraden für $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und $\text{Ba}(\text{OH})_2$ zusammen.

Die gleiche Gesetzmäßigkeit ergibt sich auch noch auf einem anderen Wege. *Michaelis* und *Rona* finden z. B., daß die OH' -Adsorption aus NaOH -Lösungen in Gegenwart von NaCl in hohen Konzentrationen begünstigt wird. Entsprechend steigert Zusatz von NaCl (oder KCl) die Oxydationsgröße bei gleicher OH' -Konzentration.



Oxydationsgröße und OH' -Konzentration in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und NaOH .

Abb. 4b. Oxydationsgröße als Funktion der adsorbierten OH' -Menge (in Millimol).

▲ I–IV = $\text{Ba}(\text{OH})_2$, ○ V–IX = NaOH , ⊗ X = $\text{NaOH} + \text{NaCl}$.

Die römischen Nummern stimmen mit Tabelle VI überein.

Tabelle VI.

Lösung Nr.	Stoff	n OH' vor Adsorption	n OH' nach Adsorption	Adsorbierte Millimol pro 2 cmm	O_2 in 2 h pro 0,05 g Kohle
I	$\text{Ba}(\text{OH})_2$	0,230	0,2140	0,0320	75
II	"	0,1165	0,1025	0,0280	62,5
III	"	0,0583	0,0466	0,0235	51
IV	"	0,0290	0,0193	0,0195	37,5
V	NaOH	0,2426	0,231	0,0232	50,5
VI	"	0,1158	0,106	0,0195	36
VII	"	0,0573	0,0505	0,0147	25
VIII	"	0,0286	0,0224	0,0123	18

Versuche. Aus 0,05 n NaOH wurde adsorbiert direkt 0,0143 Millimol OH'. In Gegenwart von 4 n NaCl 0,0215 Millimol OH'.

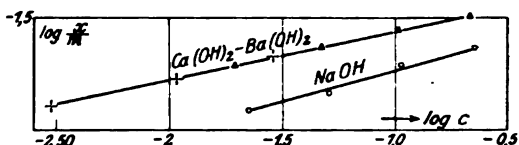


Abb. 5. Adsorbierte OH'-Menge als Funktion der Gleichgewichtskonzentration für $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und NaOH im logarithmischen Netz.
 Δ $\text{Ba}(\text{OH})_2$, $\div$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\circ$ NaOH.

Dementsprechend betrug die Oxydationsgröße im ersten Falle in 2 Stunden 24 cmm O_2 , im zweiten Falle 37 cmm O_2 .

Diese Resultate sind als Punkt X in der Abb. 4a und b eingetragen. Während der auf Abb. 4a erheblich höher als die NaOH-Kurve gelegen ist, liegt er in Abb. 4b ganz in der Nähe der Geraden.

Da es mittels der Erdalkalien gelungen ist, eine erhebliche Oxydationsgeschwindigkeit schon bei einer OH'-Konzentration von $n/100$ und weniger zu erzielen, so lag es nahe, zu noch niedrigeren OH'-Werten die sich dem Bereich der physiologisch vorkommenden nähern, herab-

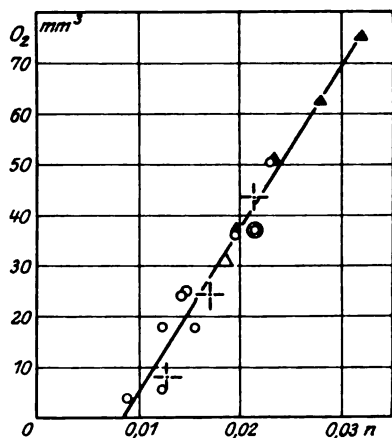


Abb. 6. Oxydationsgröße in Abhängigkeit von der adsorbierten OH'-Menge für verschiedene Kohlepräparate.
 Δ $\text{Ba}(\text{OH})_2$, $\circ$ NaOH, $\div$ $\text{Ca}(\text{OH})_2$,
 $\odot$ NaOH + NaCl, $\triangle$ AgOH.

zugehen, indem man Hydroxyde wählt, deren Kation noch stärker adsorbiert wird als Erdalkali. Nach Michaelis und Rona gilt dies für die Hydroxyde der Edelmetalle. Als relativ gut löslich empfahl sich das Silberhydroxyd. Wurde nun frisch gefälltes Silberhydroxyd in Wasser aufgeschwemmt zu Kohle gegeben, so zeigte sich eine gut meßbare Oxydation, während die Lösung ein p_H von 9,4 besaß. Diese Sauerstoffzehrung ist nicht anders zu deuten, als daß aus der Hydroxydlösung eine sehr große Menge OH' adsorbiert wird, wobei der Vorrat ungelösten AgO die wegadsorbierten OH-Ionen nachliefert. Tatsächlich

liegt der durch Extrapolation gefundene Wert (s. bei Versuchen) für die adsorbierte OH'-Menge fast genau auf der Geraden, die die Oxydationsgeschwindigkeit als Funktion des adsorbierten OH' bei den Alkalien und Erdalkalien darstellt (Abb. 6). Daß das Ag-Ion selbst für die Oxydation nicht in Betracht kommt, ergibt sich daraus, daß in Silbernitratlösung trotz ebenso starker Ag-Adsorption an Kohle keine Oxydation stattfindet.

Versuche. Die Oxydationsversuche gelingen nur mit *frisch* gefälltem, ausgewaschenem Silberhydroxyd, das im Überschuß in der Lösung vorhanden ist. Der Vorrat gelösten AgO ist zu gering (Löslichkeit etwa $n/10\,000$); die Lösung würde durch die Adsorption ohne Nachlieferung von neuem in Lösung gehenden AgO völlig an AgOH verarmen. Damit diese Nachlieferung schnell genug geschieht, muß sich das AgO in feiner Verteilung befinden, was bei frisch gefälltem Oxyd, aber nur bei diesem der Fall ist. Dies wurde so kontrolliert, daß die OH'-Konzentration einer mit AgO geschüttelten und filtrierten Lösung verglichen wurde mit einer solchen, der außer AgO noch 0,5 g Kohle auf 10 ccm zugesetzt war. Beide Filtrate zeigten dieselben OH'-Konzentrationen im Vergleich mit *Sørensen*'schem Glykokollgemisch $p_H = 9,36$.

Das AgO wurde aus AgNO_3 und im Überschuß zugegebener kohlen-säurefreier Natronlauge hergestellt. Die Fällung wurde zehnmal in der Zentrifuge gewaschen. Nach etwa fünfmaligem Waschen ändert sich die OH'-Konzentration der Lösung nicht mehr.

Oxydationsversuche.

Tabelle VII.

Je 0,1 g Kohle in 2 ccm Flüssigkeit.

Kohle- präparat Vers. Nr.	Lösung	Zeit	cm ³ O ₂
I. 1	destilliertes Wasser	2 ^h	0
	AgOH	2	18
	„	2	17,5
II. 2	„	1 ^h 30'	14
	0,026 AgNO_3	1 30	0
II. 3	destilliertes Wasser	2 ^h 10	3
	0,5 n NaOH	2 10	98
	AgOH	2 10	29

Um nun die adsorbierte AgOH-Menge in diesen Versuchen zu erfahren, bedienen wir uns der folgenden Extrapolation: Setzen wir zu gleich großen Flüssigkeitsvolumina, die mit AgOH gesättigt und filtriert sind, verschiedene Mengen Kohle, aber immer nur so wenig, daß die Flüssigkeit nur teilweise an AgOH verarmt und bestimmen in jedem Falle die Gleichgewichtskonzentration und aus der Differenz dieser mit der Anfangskonzentration gleichzeitig die adsorbierte Menge, so erhalten wir eine Kurve, die wir in grösster Annäherung als Gerade betrachten. Aus dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate der Sättigungskonzentration entnehmen wir die im Oxydationsversuch adsorbierte Menge.

Da die AgOH-Konzentration nur etwa $n/10\,000$ beträgt, so kommt für die Bestimmung nur eine empfindliche Silbertitration in Betracht. Wir titrierten nach *Volhard* je 100 ccm mit einer $n/1000$ Rhodanidlösung, wobei der Umschlagspunkt durch Vergleich mit Standardlösungen festgelegt wurde, die aus Verdünnungen von $n/10$ Silbernitrat bereitet wurden.

Da das Silbercarbonat weniger löslich ist als das Silberhydroxyd, mußte sorgfältig auf die Abwesenheit von Kohlensäure geachtet werden. Daher

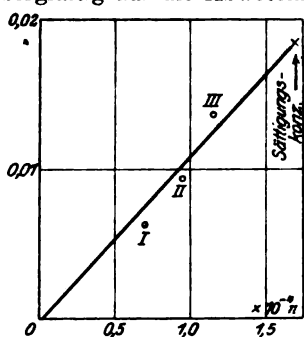


Abb. 7. Adsorbierte OH'-Menge in AgOH-Lösungen. Ordinate: adsorbierte Millimol. Abszisse: Gleichgewichtskonzentration.
× Sättigungskonzentration.

wurde die Lösung aus einem Schütteltrichter, der mit Asbestfilter versehen war, durch Bombensauerstoff unter Druck filtriert, wobei alle Gefäße mit Natronkalkröhrchen versehen waren. Der Versuch wurde bei künstlichem Lichte angestellt, um Silberreduktion zu vermeiden. Die gefundenen Werte sind im folgenden Versuchsbeispiel angeführt und in Abb. 7 eingezeichnet. ×-Zeichen entspricht der Sättigungskonzentration. Die Titration ist etwa auf 10 % genau. In anderen Versuchen, die aber nicht so genau waren, erhielten wir etwas andere Zahlen. Doch wird der Wert für die adsorbierte Menge bei der Sättigungskonzentration, gleich 0,0185 Millimol, dadurch nur wenig verschoben.

Adsorptionsbestimmung.

Tabelle VIII. Je 250 ccm Flüssigkeit. Kohlepräparat II.

Kohle- menge	Anfangs- titration Ag-Gehalt pro 1 Liter 10^{-4} mol	Endtitration Ag-Gehalt pro 1 Liter 10^{-4} mol	Adsorbierte Menge in Milli- mol pro 0,05 g Kohle aus 250 ccm
0,2	1,7	0,6	0,0063
	1,7	0,8	
0,1	1,7	1,0	0,0094
	1,7	0,9	
0,05	1,7	1,15	0,0137
	1,7	1,15	

Das benutzte Kohlepräparat entspricht dem Oxydationsversuch 3.

Auf Abb. 6 sind sämtliche Messungen, bei denen gleichzeitig Oxydationsgröße und OH'-Adsorption bestimmt wurde, vereinigt. Da die Kurve mit verschiedenen Kohlepräparaten gewonnen wurde, bei denen, wie schon eingangs erwähnt, die Proportion Oxydationsgeschwindigkeit : OH-Menge nicht gleich ist — offenbar wegen Variation der Menge oxydabler Substanz —, so zeigen die Werte notwendigerweise eine gewisse Streuung. Der Punkt für AgOH (aus Oxydationsversuch 3 und der obigen Adsorptionsmessung gewonnen) liegt aber befriedigend auf der Durchschnittsgeraden.

Die Selbstoxydation der Kohle zeigt in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Hydroxyden eine bemerkenswerte Analogie zu der Atmung der Seeigelleier¹⁾. Auch diese wird durch alkalisches Seewasser mächtig gesteigert, wobei es sich nach Warburg allein um eine

¹⁾ Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 66, 305, 1910.

Wirkung auf die Grenzschicht des Eies handelt, da die OH' -Ionen nicht ins Innere des Eies eindringen. Während nun bei Zusatz von Natronlauge zu Seewasser bei einer OH' -Konzentration von 10^{-3} die Atmung des befruchteten Eies verdoppelt ist, kann man einen ähnlichen, nicht ganz so starken Effekt schon durch Spuren von gewissen Schwermetallsalzen erzielen, nämlich 10^{-5} Ag oder Au und 10^{-4} Cu, während Co, Ni, Fe, Sn, Zn, Cd, Pb, Pt unwirksam sind. Es fällt hier auf, daß die wirksamen Metalle diejenigen sind, die nach Michaelis und Rona von Kohle am stärksten adsorbiert werden (Pt scheint von ihnen nicht untersucht zu sein). Also auch im Seeeglei dürfte die Atmungssteigerung auf die Adsorption des Metallsalzes zurückzuführen sein. Ja, möglicherweise geht die Analogie noch weiter, indem auch hier die Metalle nur als Vehikel für die stärkere Adsorption von OH' dienen. Dies ließe sich entscheiden, indem dann die Atmungssteigerung durch Metallspuren in schwach saurem Seewasser ausbleiben muß.

Genau die gleiche Gesetzmäßigkeit findet sich aber bei Hydroxyden von organischen Kationen, und hier ist sogar entsprechend der noch stärkeren Adsorbierbarkeit derselben die Selbstoxydation der Kohle bei gleichem OH' noch größer als bei Silberhydroxyd. Dies Verhalten findet sich z. B. bei den stärker dissoziierten Aminen, wie Äthylamin, Guanidin usw., und hierdurch wird eine Oxydation derselben um so eher vorgetäuscht, als ja die Aminosäuren, sowie leicht oxydable aromatische Amine, z. B. Anilin, Amidophenol, tatsächlich mit großer Geschwindigkeit an Kohle verbrannt werden.

Äthylaminhydrochlorid wird in neutraler Lösung so gut wie gar nicht oxydiert. Bei Zusatz eines Boratpuffergemisches von p_{H} 9 aber findet eine erhebliche Oxydation statt. Diese beruht nicht etwa auf der Freimachung der Base und Verbrennung von dieser, sondern auf nichts anderem als der Oxydation der Kohle, die der starken OH' -Adsorption in Gegenwart von Äthylamin entspricht. Dasselbe ergibt ein Vergleich der Atmungsgröße noch etwas stärker alkalischer Äthylaminlösung (Äthylaminhydrochlorid und NaOH) mit einer NatronlaugeLösung von ähnlicher Konzentration, wobei der Sauerstoffverbrauch der ersteren enorm viel stärker ist. Bestimmt man in beiden Fällen die adsorbierten OH' -Mengen, so sind diese dem Sauerstoffverbrauch genau proportional und die Adsorptionsoxydationskurve eine Gerade (Abb. 8).

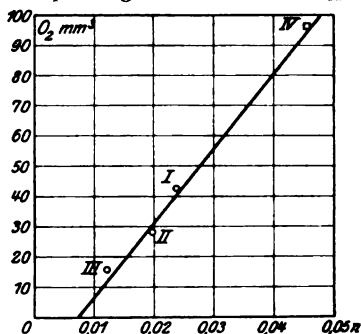


Abb. 8. Oxydationsgröße als Funktion der adsorbierten OH' -Menge in NaOH und Äthylamin. ○ NaOH . □ Äthylamin.

*Äthylaminversuch.**Tabelle IX.*

Oxydationsbestimmungen, je 0,1 g Kohle auf 2 ccm.
(Ae = Äthylaminhydrochlorid.)

Nr.	Zeit	Zusammensetzung der Lösung	O ₂ ccm
1	1h 40'	1,0 ccm n/4 Ae + 1,0 destilliertes Wasser	2
	1 40	0,8 ccm n/4 Ae + 0,2 n/10 NaOH + 1,0 destilliertes Wasser	109
	1 40	0,2 ccm n/10 NaOH + 1,8 destilliertes Wasser	37
	1 40	1,0 ccm n/4 Ae + 1,0 Borat p_H 9,1	30
2 I	1	2,0 „ n/5 NaOH	42
Ia	1	2 „ „ „	42
II	1	2,0 „ n/10 „	25
IIa	1	2,0 „ „ „	28
III	1	2,0 „ n/20 „	16,5
IIIa	1	2,0 „ „ „	16
IV	1	1 „ n/5 Ae + 1 n/5 NaOH	99
IVa	1	1 „ „ „ + 1 „ „	95
V	1	1 „ „ „ + 1 Borat p_H 9,24	33

Adsorptionsbestimmungen.

Hierzu diene dasselbe Kohlepräparat und die gleiche Lösung wie für den Oxydationsdoppelversuch 2 (vgl. die römischen Zahlen).

Tabelle X.

Je 3 g Kohle auf 60 ccm.

Nr.	Ausgangslösung in n Ori'	Gleichgewichtslösung in n OH'	Adsorbierte Mol.mol
I	0,2005	0,1763	0,0242
Ia	0,2050	0,1823	0,0230
II	0,1032	0,0830	0,0203
IIa	0,1032	0,0895	0,0188
III	0,0499	0,0373	0,0122
IIIa	0,0499	0,0377	0,0126
IV	0,1001 + Ae	0,0543	0,0458
V	0,1001 + Ae	0,0555	0,0446

Aus dem Mittel der Bestimmungen dieses Adsorptionsversuchs und des obigen Oxydationsversuchs 2 ist die Kurve (Abb. 8) konstruiert. Der Wert für Äthylamin liegt befriedigend genau auf der Geraden. (Daß die Gerade hier wie in den anderen Fällen nicht durch den Nullpunkt geht, ist durch den Kohlensäuregehalt der Natronlauge verursacht.)

IV. Orientierende Versuche über die Oxydation organischer Substanzen an Kohle.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß Kohlehydrate und Fettsäuren in neutraler Lösung an Kohle kaum oxydiert wurden, haben wir zahlreiche Versuche gemacht, um derartige Substanzen in der adsorbierten OH'-Schicht, also z. B. mit Zusatz von Silberhydroxyd bei geringer OH'-Konzentration der Lösung zur Oxydation zu bringen. Diese Versuche verliefen negativ; ja unter diesen Umständen wurden sogar andere Oxydationen, z. B. die der Aminosäuren, gehemmt. Die Oxydationsgeschwindigkeit dieser ist zwar bei ganz leicht alkalischer Reaktion (p_H etwa 8 bis 9) etwas größer als in neutraler Lösung¹⁾, nimmt aber bei stärkerer Alkaleszenz und ebenso bei Anwesenheit von AgO erheblich ab. Vielleicht beruht dies auf einer Verdrängung.

Eine andere Kombination, die wir versucht haben, war die von Kohlehydrat oder Milchsäure mit der Sulfhydrylgruppe. Der eine von uns konnte vor einigen Jahren zeigen²⁾, daß man mittels der SH-Gruppe — benutzt wurde Thioglykolsäure — Sauerstoff auf gewaschene Acetonhefe übertragen kann, indem das Vielfache desjenigen Sauerstoffs aufgenommen wird, der für den Übergang von 2 SH in S—S erforderlich ist. Dies geschieht gerade in neutraler und schwach saurer Lösung, wo die Thioglykolsäure für sich an der Luft beständig ist. Nun wird Thioglykolsäure in neutraler und schwach saurer Lösung an Tierkohle leicht oxydiert, und es wird etwas mehr Sauerstoff dabei aufgenommen als für die Disulfidbildung nötig ist, gleichzeitig wird Schwefelsäure gebildet. Die Dithiodiglykolsäure unterliegt also selbst der langsamen Oxydation. Dagegen ergab Kombination mit Kohlehydrat kein deutliches Mehr an Sauerstoff.

Was nun die Oxydation von organischen Säuren und der Kohlehydrate in neutraler Lösung betrifft, so gilt zunächst allgemein, daß sie sehr viel schwächer ist als die der Aminosäuren und häufig nicht nachweisbar. Dabei lassen nur solche Kohlepräparate, die in neutraler Lösung eine eben meßbare Selbstoxydation aufweisen, noch am ehesten eine geringe Oxydation auch der organischen Zusätze erkennen. So wird z. B. die Oxydation von bernsteinsaurem Na und glutarsaurem Na nachweisbar, ist aber erheblich schwächer als die von asparaginsaurem Na und glutaminsaurem Na. Ähnliches gilt für milchsaures Na.

Hinsichtlich der Kohlehydrate ist bemerkenswert, daß allein Hexosephosphorsäure in meßbarer Weise oxydiert wird, ein Vorgang, bei dem eine äquivalente Menge Kohlensäure gebildet wird und der

¹⁾ Dies ist inzwischen auch von *Ph. Ellinger* und *Landsberger* festgestellt. H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. **123**, 264, 1922.

²⁾ *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **170**, 428, 1918.

durch Narkotika gehemmt wird. Diese Oxydation ist besonders deutlich, wenn das schwer lösliche, hexosephosphorsaure Calcium (Candiolin) ohne Filtration direkt zu Kohle gegeben wird. Glucose wird überhaupt nicht erkennbar, Fructose wenig oxydiert. Die Oxydation der Hexosephosphorsäure steht wohl mit der Fructosekomponente im Zusammenhang bzw. mit dem Gehalt an polymerisiertem Zucker. Die stärkere Oxydationsfähigkeit der Hexosephosphorsäure entspricht völlig ihrem Verhalten gegenüber dem wasserextrahierten Muskel und dem ultrafiltrierten Hefeextrakt, wie es von dem einen von uns beschrieben wurde¹⁾.

Einige Versuche mit Kohlehydraten mögen das Gesagte erläutern.

Tabelle XI.

Stets je 0,1 g Kohle in 2 ccm Lösung und eine Kontrolle ohne Kohle.

Nr.	Zeit	Kohl- zusatz	Salz bzw. Kohlehydrat	O ₂ cmm	CO ₂ cmm
1	5 ^h	0,1	destilliertes Wasser	6	—
		0,1	hexosephosphorsaures Ca	64	—
		—	hexosephosphorsaures Ca ohne Kohle	10	—
2	4	0,1	CaCl ₂ + Na ₂ HPO ₄	27	—
		0,1	0,08 g hexosephosphorsaures Ca in Na ₂ HPO ₄	67	—
		0,1	0,02 g Glucose in Na ₂ HPO ₄	12	—
		0,1	0,02 g Glucose in CaCl ₂	15	—
		—	0,08 g hexosephosphorsaures Ca in Na ₂ HPO ₄ ohne Kohle	14	—
		0,1	destilliertes Wasser	18	—
		0,1	0,3 n milchsaures Na	29	—
3	4 50'	0,1	Ca ₂ HPO ₄	29	—
		0,1	0,1 g hexosephosphorsaures Ca	73	—
		0,1	0,1 g hexosephosphorsaures Ca in 100 % O ₂	87	—
		—	hexosephosphorsaures Ca ohne Kohle	12	—
		0,1	destilliertes Wasser	8	—
		0,1	Fructose (polymerisiert)	17	—
		0,1	hexosephosphorsaures Ca	38	—
5	3 40'	0,1	Na ₂ HPO ₄	8	—
		0,1	0,06 g hexosephosphorsaures Ca in KH ₂ PO ₄	44	—
		0,1	0,06 g hexosephosphorsaures Ca in 2 % Äthylurethan	6	—
6	5	0,1	0,06 g hexosephosphorsaures Ca in KH ₂ PO ₄	52	46.5

¹⁾ O. Meyerhof, Pflügers Archiv 170, 428, 1918; H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. 102, 1, 1918.

Zusammenfassung.

1. Die Arbeit beschäftigt sich mit der Selbstoxydation der Kohle in alkalischer Lösung. Die Oxydationsgeschwindigkeit hängt ab von der Aufbewahrung der Kohle, dem Sauerstoffdruck (in 100 % O_2 60 % gesteigerte Oxydation gegenüber Luft), der Temperatur (Temperaturkoeffizient 1,75). Es wird dabei Kohlensäure gebildet entsprechend 1 bis 0,5 Äquivalenten des Sauerstoffverbrauchs. Die Wärmebildung beträgt etwa 4 cal. pro 1 cm O_2 , wie bei gewöhnlichen Oxydationsvorgängen organischer Moleküle.

2. Die Oxydation wird durch Narkotika (Urethane) in typischen Konzentrationen gehemmt; ist also nach Warburg eine Oberflächenkatalyse. Hierbei wird nicht das OH' , sondern der oxydable Stoff von der Kohlenoberfläche verdrängt.

3. Die Oxydationsgröße ist von der OH' -Konzentration der Lösung ganz unabhängig und allein abhängig von der adsorbierten OH' -Menge, und zwar dieser genau proportional. Es ergibt sich dies aus dem Vergleich der Sauerstoffzehrung und der adsorbierten OH' -Menge bei verschiedenen Hydroxyden. Entsprechend der zunehmend stärkeren Adsorbierbarkeit bei Alkalihydroxyden, Erdalkalihydroxyden (Ba, Ca), Silberhydroxyd, Äthylaminhydroxyd steigt die Oxydationsgröße in dieser Reihe bei gleicher OH -Außenkonzentration, so daß sie in letzterem Falle schon bei einem p_H von etwa 9 in der Außenlösung sehr deutlich ist.

4. Die Aminosäuren sind von den dysoxydablen Nährstoffen der Zelle an der Kohlenoberfläche durch eine besonders große Unbeständigkeit ausgezeichnet. Es gelang bisher nicht, andere physiologisch wichtige Verbindungen zu finden, die sich ähnlich verhalten. Immerhin ist auffällig, daß von den Kohlehydraten Hexosephosphorsäure deutlich, wenn auch relativ schwach unter Kohlensäurebildung oxydiert wird, Glucose nicht merklich, Fructose und Milchsäure höchstens spurenweise.

Über die Bestimmung zell- und keimschädigender Substanzen auf biologischem Wege.

III. Mitteilung.

Chinin.

Von

T. Hishikawa.

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1922.)

Es gibt verschiedene Verfahren zum Nachweis verschiedener Chininsalze.

Die stöchiometrischen und gewichtsanalytischen Methoden arbeiten am genauesten, gestatten aber nicht, ganz geringe Mengen von Chinin, wie sie unter physiologischen Verhältnissen in Betracht kommen, nachzuweisen. Es war daher seit jeher das Bestreben, Methoden ausfindig zu machen, die unter Verzicht auf ganz exakte Befunde die Möglichkeit geben würden, Substanzmengen zu bestimmen, welche um ein Mehrfaches kleiner sein könnten als die auf gewichtsanalytischem Wege feststellbaren. Zu solchen Methoden gehören z. B. das Verfahren von *Hartmann* und *Zila*, bei welchem die mit dem Kaliumquecksilber entstehende Verbindung des Chinins noch in ganz dünnen Lösungen eine mit dem Fluoreszenzmikroskop wahrnehmbare Verfärbung zeigt. Das zuletzt von *P. Rona* angegebene Verfahren bedient sich der Fähigkeit des Chinins, die Tributerinspaltung durch Serumlipase noch in dünnen Lösungen zu hemmen, um dieses Alkaloid nachzuweisen.

Viel interessanter, jedoch noch wenig ausgearbeitet, sind die sogenannten biologischen Verfahren, bei denen die Reaktion lebender Keime und Zellen im allgemeinen unter dem Einfluß ganz verdünnter Lösungen wirksamer Substanzen durch Beeinflussung verschiedener Lebensäußerungen nachweisbar ist. So versuchten *Morgenroth* und *Ginsberg* durch Feststellung jener Grenzkonzentrationen des Chinins, welche noch imstande waren, die Kaninchenhornhaut unempfindlich zu machen, das Chinin quantitativ zu bestimmen. Jedoch war es bei diesem Verfahren nicht möglich, höhere Verdünnungen des Alkaloids quantitativ nachzuweisen. Auch das von *Retzlaff* beschriebene Verfahren, welches auf der Immobilisierung von Paramäcien durch Chinin beruht, gestattete nur, Chininkonzentrationen bis 1:80000 nachzuweisen. Auch sind die bei den letztgenannten Verfahren bestehenden technischen Schwierigkeiten derart groß, daß ihre Verallgemeinerung deswegen nicht zu erwarten war. Dagegen ließ das von *Schnabel* beschriebene Verfahren zum Nachweis von Optochin in millionenfachen, ja sogar in milliardenfachen Verdünnungen erwarten, daß es möglich

sein könnte, auch das dem Optochin nahestehende Chinin in relativ hohen Verdünnungen nachzuweisen.

Schnabel hat in Band 108 dieser Zeitschrift vom Jahre 1920 diese Methode näher beschrieben; sie beruht auf der Fähigkeit von Bakterien (und Zellen im allgemeinen), Methylenblau in eine farblose Verbindung, die sogenannte Leukobase, umzuwandeln, und auf der Eigenschaft verschiedener zell- und keimschädigender Substanzen, diese Reduktion des Methylenblaus in weitgehender Verdünnung zu hemmen. Das zuerst für Optochin beschriebene Verfahren hat zwar bereits auch für Chinin Anwendung gefunden, doch wurde hieüber in systematischen Versuchen noch nichts mitgeteilt.

Während beim Optochin die Frage nach einem reduzierenden und gleichzeitig empfindlichen Substrat in den Pneumokokken dank deren hochausgeprägter Empfindlichkeit dem Optochin gegenüber ihre Lösung gefunden hat, war dies beim Chinin von vornherein nicht so leicht. Wohl gibt es Zellen, welche die Fähigkeit haben, Methylenblau zu entfärben und gleichzeitig auf Chinin zu reagieren; zu solchen gehören in erster Linie die Leukocythen verschiedener Tierarten. Aber die relativ kurze Lebensdauer dieser Zellen und vor allem ihre nicht leichte Beschaffbarkeit ließen es als zweckmäßig erscheinen, nach einem anderen Substrat zu suchen. Dasselbe wurde in einzelnen Pneumokokkenstämmen gefunden, welche nicht allein dem Optochin, sondern auch dem Chinin gegenüber sich als empfindlich erwiesen haben. Wohl waren die auf diese Weise feststellbaren Chininverdünnungen nicht so hoch wie beim Optochin, bei weitem aber höher als die auf jede andere Weise nachweisbaren. Im übrigen lehnte sich das hier beschriebene Verfahren vollkommen an das von *Schnabel* angegebene.

Die Versuche gliederten sich jeweils in zwei Teile. Während in Vorversuchen jene kleinste Bakterienmenge bestimmt wurde, welche noch imstande war, nach einer bestimmten Zeit, z. B. nach 2 Stunden, einen Tropfen Methylenblau zu entfärben, dienten die Hauptversuche dazu, die kleinste Chininmenge zu bestimmen, welche diese Entfärbung zu hemmen vermochte. Ein derartiger Versuch sei hier angeführt:

24stündige Kulturen eines chininempfindlichen Pneumokokkenstammes in Blutbouillon, welche durch Zusatz von je einem Tropfen Blut zu 1 cem Nährbouillon erhalten wurde, wurden in fallenden Mengen in Röhren von 0,6 cm Durchmesser abgefüllt, mit Nährbouillon auf ein Gesamtvolumen von 1 cem gebracht, mit einem Tropfen einer bestimmten Methylenblaulösung¹⁾ gemischt, mit sterilem Paraffinöl überschichtet und in den Brutschrank bei 37° C gestellt. Zu verschiedenen Zeiten wurde der Entfärbungsvorgang, der sich allmählich von den Röhren mit größeren Kulturmengen auf die mit kleineren ausdehnte, beobachtet und schließlich

¹⁾ *Schnabel*, diese Zeitschr. 108.

jene Menge notiert, welche nach 2 Stunden das zugesetzte Methylenblau eben noch vollkommen zu entfärben vermochte. In den meisten Fällen betrug diese Dosis minima erducens genannte Menge 0,2 cem unverdünnter Kultur.

Der Hauptversuch wurde in der Regel so angesetzt, daß zu fortlaufenden Verdünnungen des salzsauren Chinins in 0,5 cem Nährbouillon 0,5 cem der derart verdünnten Pneumokokkenkultur zugesetzt wurde, daß nach dem Zusammenmischen mit dem $\frac{1}{2}$ cem der chininhaltigen Bouillon 0,2 cem Originalkultur enthalten war. Nach Zusatz von einem Tropfen Methylenblau zu jedem Röhrchen und nach Durchmischen bzw. Übersichten mit Paraffinöl kamen die Reagenzgläser in den Brutschrank; mehrere chininfreie, 0,2 cem Kultur bei einem Gesamtvolumen von 1 cem Nährbouillon enthaltende, ebenfalls mit Methylenblau gemischte und mit Paraffinöl überschichtete Röhrchen dienten als Kontrollen. Zu verschiedenen Zeiten wurde nachgesehen und im Moment, wo die Kontrollen entfärbt waren, was in der Regel nach 2 Stunden der Fall war, der Stand der Methylenblauentfärbung in der chininhaltigen Reihe notiert.

Vorversuch.

Ein Tropfen folgender Methylenblaulösung wird zu jedem Röhrchen hinzugefügt: Methylenblau 1 g, Alkohol absolut 20 g, destilliertes Wasser 29 g; von dieser Stammlösung wurde 1 cem jedesmal frisch zu 49 cem physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt und so die gebrauchte Lösung erhalten. Übersichtung mit Paraffinöl.

1 cem Kultur	+	0,0 cem Bouillon
0,9 „ „	+	0,1 „ „
0,8 „ „	+	0,2 „ „
0,7 „ „	+	0,3 „ „
0,6 „ „	+	0,4 „ „
0,5 „ „	+	0,5 „ „
0,4 „ „	+	0,6 „ „
0,3 „ „	+	0,7 „ „
0,2 „ „	+	0,8 „ „
0,1 „ „	+	0,9 „ „

Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° C zeigen die ersten vier Röhrchen vollkommene Entfärbung, während das fünfte, 0,6 cem Kultur enthaltende Röhrchen nur teilweise entfärbt ist. Nach 2 Stunden sind sämtliche Röhrchen bis auf das letzte vollständig entfärbt; das Röhrchen mit 0,1 cem zeigt beginnende Reduktion des Methylenblaus. Die Dosis minima erducens beträgt also 0,2 cem.

Hauptversuch.

Ein Tropfen Methylenblaulösung pro Röhrchen, Übersichtung mit Paraffinöl, 37° C.

0,2 cem Kultur	+	0,3 cem Bouillon	+	0,5 cem Chinin	1: 10 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 20 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 40 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 80 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 160 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 320 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 640 000
0,2 „ „	+	0,3 „ „	+	0,5 „ „	1: 1 280 000

Kontrollen: 0,2 ccm Kultur + 0,8 ccm Bouillon.

Nach zweistündigem Aufenthalt bei 37° C sind die Kontrollen, welche kein Chinin enthalten, entfärbt, während von der chininhaltigen Reihe nur die zwei letzten Röhrchen mit einem Chiningehalt von 1 : 640 000 bzw. 1 : 1280 000 Entfärbung zeigen; die übrigen Reagenzgläser bis zur Chininverdünnung 1 : 320 000 erscheinen blau. Nach weiteren 30 Minuten, also nach insgesamt 2½ Stunden, beginnt sich auch das Röhrchen mit Chinin 1 : 320 000 zu entfärben.

Aus diesem letzten Versuch folgt also, daß es möglich ist, mit chininempfindlichen Pneumokokkenstämmen relativ hohe Verdünnungen des Alkaloids im angeführten Versuch bis 1 : 320 000 zu bestimmen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß nur bestimmte Pneumokokkenstämme sich zu dieser Bestimmung eignen, und zwar solche, die einen entsprechenden Grad von Empfindlichkeit Chinin gegenüber besitzen. Die meisten Laboratoriumsstämme zeigen sich weniger empfindlich, und zwar vermögen erst Chininkonzentrationen von 1 : 50 bis 1 : 100 000 die Reduktion des Methylenblaus durch Pneumokokken zu beeinträchtigen. Es wurde daher versucht, durch Anwendung entsprechender Versuchsbedingungen auch die weniger empfindlichen Pneumokokkenstämme der Chininbestimmung in höheren Verdünnungen dienstbar zu machen. Als hierzu geeignet erwies sich die von *Schnabel* angegebene Modifikation, bei der die mit Kultur und wirksamer Substanz beschickten Röhrchen ein bis mehrere Stunden im Eiskasten gehalten werden. Nach dieser Vorbehandlung waren auch höhere Chininverdünnungen imstande, die Entfärbungsfähigkeit weniger empfindlicher Pneumokokkenstämme zu beeinträchtigen, und zwar erwiesen sich Konzentrationen bis 1 : 200 000 bei Anwendung weniger empfindlicher Stämme und Konzentrationen bis 1 : 1 Million oder 1 : 2 Millionen des salzsauren Chininsalzes bei Anwendung von empfindlicheren Stämmen als wirksame Grenzkonzentration.

Die Heranziehung breiterer Versuchsröhrchen, die Übersichtung mit weniger Paraffinöl oder die Anwendung von Kochsalzlösung als Verdünnungsflüssigkeit an Stelle von Nährbouillon machten sich in der Weise bemerkbar, daß erst größere Kulturmengen imstande waren, Methylenblau zu entfärben. Entsprechende Versuche wie bei 37° C wurden auch bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, also bei etwa 18 bis 20° C, unternommen. Bei dieser Versuchsanordnung waren noch dünnere Chininlösungen, manchmal 1 : 10 bis 1 : 20 Millionen imstande, die Entfärbung des Methylenblaus zu hemmen. Die bei letztgenannter Versuchsanordnung erzielten Resultate sind aber nicht genau genug, um quantitativen Messungen dienen zu können, so daß sich die Entfärbung bei Zimmertemperatur höchstens auf qualitative Ermittlungen des Chinins beschränken muß.

Zusammenfassung.

Es gelingt, durch Anwendung geeigneter Pneumokokkenstämme Chininverdünnungen bis 1 : 320 000 zu bestimmen, wenn man die Entfärbung des Methylenblaus durch Pneumokokken bzw. deren Hemmung durch Chininlösungen als Indikator anwendet. Die meisten Pneumokokkenstämme vermögen nur in einer Verdünnung 1 : 40 000 bis 1 : 80 000 des salzsauren Chinins in ihrem Reduktionsvermögen Methylenblau gegenüber beeinträchtigt zu werden. Doch ermöglicht es die Vorbehandlung der Pneumokokken während einiger Stunden bei Eis-temperatur, auch höhere Verdünnungen des Alkaloids zu bestimmen. Das Reduktionsvermögen bei Zimmertemperatur gestattet, Chininlösungen um 1 : 10 Millionen herum, jedoch nur ungenau, festzustellen.

Literatur.

Hartmann und Zila, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 83, 1918. — *Rona*, diese Zeitschr. 111, 118, 121, 1921. — *Morgenroth und Ginsberg*, Berlin. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 46; 1913, Nr. 18. — *Retzlaff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1921. — *Schnabel*, diese Zeitschr. 108, 1920.

Zur Kritik der de Waardschen Mikromethode.

Von

Kurt Blühdorn und Grete Genek.

(Aus der Universitätskinderklinik in Göttingen.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1922.)

Die von *de Waard* angegebene Methode zur Bestimmung des Calciums in kleinen Mengen Blutserums durch direkte Fällung als Oxalat ist wegen der relativ geringen notwendigen Serummenge, der Einfachheit ihrer Handhabung und der billig zu beschaffenden Apparatur allgemein in der Pädiatrie angewandt worden. Bezüglich Einzelheiten der Methodik verweisen wir auf die Originalmitteilung *de Waards* (diese Zeitschr. 98).

De Waard prüfte seine Methode gegen eine Mikromethode, die er für das Gesamtblut angegeben hatte und die in trockener Veraschung des Blutes und Fällung des Calciums als Oxalat in essigsaurer Lösung und nachfolgender Titration gegen $n/100 \text{ KMnO}_4$ bestand, einer Methodik, die, abgesehen von der Veraschung, in gleicher Weise wie die Verarbeitung des Calciumoxalats im Serum direkt gehandhabt wurde. Diese Fällung in essigsaurer Lösung ist allerdings in der analytischen Chemie als nicht ganz zuverlässig fallen gelassen. Die Nachprüfung ist demnach auch nicht ganz exakt. *R. Mayer*, der die Methode nachprüfte, fand 1% Fehler. Aus seinen Darlegungen ist nicht ersichtlich, in welcher Weise er die Nachprüfung vorgenommen hat. Den Einwand von *Jansen*, daß nur der ionisierte Teil des Ca gefällt würde, widerlegte *de Waard* durch die Feststellung, daß ionisierter wie nicht ionisierter Anteil des Ca im Serum miteinander im Gleichgewicht stehen, daß also, falls der ionisierte Anteil durch das Ausfällen geringer wird, ein entsprechender Teil des nicht ionisierten in freie Ionenform übergeht, wieder ausgefällt wird und so fort bis zum Verschwinden des gesamten Ca aus dem Serum. Wir können dies nur bestätigen, da wir in dem über dem Oxalatniederschlag befindlichen Serum und überschüssigem Oxalat nach feuchter Veraschung des Serumeiweißes nie Ca nachweisen konnten.

De Waard macht in seiner ersten Mitteilung über die Calciumbestimmung im Gesamtblut darauf aufmerksam, daß sowohl das Magnesium wie die Phosphorsäure einer direkten Fällung des Ca mit Oxalsäure im Wege stünden. Die Inklusion von Magnesiumoxalat in Calciumoxalat ist verschwindend gering, wie *de Waard* an Versuchen nachgewiesen hat, so daß sie als Fehlerquelle nicht ernstlich in Betracht kommt. Dagegen kommt er auf den Einfluß der Phosphorsäure bei der Bestimmung des Ca im Serum direkt nicht mehr zurück, und der theoretische Einwand, daß ein Teil des Ca als tertiäres Phosphat bei Zufügung von OH-Ionen ausfallen könnte und dadurch für die Titration der Oxalsäure verloren ginge, bleibt bestehen.

Es schien uns vor allem auf Grund dieser Überlegung ratsam, die Methode nochmals einer genauen Prüfung zu unterziehen. Wäre der P-Gehalt des Serums konstant, so müßten, falls die Phosphorsäure einen Fehler verursacht, die Werte immerhin relativ brauchbar sein. Aber z. B. gerade bei einem Krankheitsbild wie der Spasmodophilie, wo uns vor allem der Kalkstoffwechsel interessiert, wissen wir, daß der Gehalt an PO_4''' sehr wechselt (*Elias-Weiss*), und so könnte leicht, falls der theoretische Einwand zu Recht besteht, bei Anwendung der Methode ein nicht unerheblicher Fehler mit unterlaufen.

Da uns eine Mikrowage zur Nachprüfung der Methodik nicht zur Verfügung stand, wurden Testlösungen von bestimmtem Ca-Gehalt hergestellt. Reines, mehrfach unter Beachtung aller Vorsichtsmaßregeln (doppelt destilliertes H_2O) umgefälltes CaCO_3 , dessen Reinheit überdies noch gravimetrisch nachgeprüft wurde, wurde nach dem Abwiegen in das Chlorid übergeführt, so daß die erhebliche Wägefehler verursachende Hygroskopie des CaCl_2 vermieden wurde. Um den Einfluß von Phosphationen zu bestimmen, wurden bekannte wechselnde Mengen von sekundärem Alkaliphosphat hinzugefügt. Es kamen folgende Testlösungen zur Verarbeitung:

1. 12 mg Ca ad 100 cem.
2. 12,5 mg P }
12 mg Ca } ad 100 cem.
3. 12 mg Ca }
7,5 mg P } ad 100 cem.
4. 7,85 mg P ad 100 cem }
5. 12,5 mg P ad 100 cem } als Zusatz zu Serum.

In diesen Lösungen wurde der Gehalt an Ca nach *de Waard* bestimmt. Außerdem kamen Sera von verschiedenen Tieren (Rind, Hammel, Schwein) zur Untersuchung. Bei Handhabung der Methodik nach der Originalvorschrift stellte sich folgendes als Fehlerquelle heraus: Eine ganz geringe Menge Serumeiweiß — mit den uns zu Gebote stehenden Mitteln nicht quantitativ bestimmbar — wurde im

Oxalatniederschlag eingeschlossen, wodurch natürlich ein geringes Quantum $n/100 \text{ KMnO}_4$ reduziert wurde. Diese Eiweißmenge wurde größer, je später man nach der Entnahme das Blut verarbeitete. Deshalb ist die Verwendung ganz frischen Blutes anzuraten. Ferner kam ein Teil des Niederschlages oft nicht in die Spitze des Zentrifugenglases, sondern blieb an der seitlichen Wand haften. Es kam dann beim Abheben der über dem Niederschlag befindlichen Flüssigkeit dadurch zu einer Schleierbildung, hervorgerufen durch Aufwirbeln der an der schrägen Wand haftenden Niederschlagsteilchen durch die Flüssigkeitsbewegung, und ein Teil des Calciumoxalats wurde unvermeidlich weggehebert, oder aber das Auswaschen konnte nicht sachgemäß durchgeführt werden, um diesen Kalk nicht mit in die Pipette zu bekommen. Bei einiger Übung wurde dieser Fehler natürlich geringer, aber auch dann noch fielen einige Titrations (manchmal von vier eine) ganz aus der Reihe heraus und mußte von vornherein verworfen werden. Kontrollbestimmungen sind aus diesem Grunde unerläßlich. Die Schleierbildung war zeitweise besonders stark bei Anwendung der Testlösungen, trat aber ab und zu auch beim Serum auf, ohne daß ein Grund dafür gefunden wurde. Es lag die Annahme nahe, daß infolge Mangels an Kristallisationszentren in der Lösung etwaige Rauigkeiten in der Glaswand (obgleich nur Jenenser Glas zur Verwendung kam) die Kristallisation hier hervorriefe. Um etwaige derartige Einflüsse herabzumindern oder zu beseitigen, wurden kolloide Lösungen in verschiedenen Konzentrationen (Kaolin, Stärke) hinzugefügt, deren Teilchen die Kristallisationskeime (Kernzahl) vermehren sollten. Es trat jedoch keine bemerkbare Besserung ein. Bessere Übereinstimmungen wurden erzielt, als man der Testlösung Serum, dessen Ca-Wert nach *de Waard* vorher bestimmt war, zusetzte.

Aus einem Analysenmaterial von über 120 Analysen konnte eine mittlere Titrationsgenauigkeit (Abweichung der einzelnen Titrations und Bestimmungen voneinander) von $\pm 2,1\%$ errechnet werden, wobei die maximale Abweichung 5%, die minimale 0% betrug. Die manchmal auftretende große Abweichung ist wohl auf das mehr oder weniger große Anhaften des Niederschlages am Rande zurückzuführen. Weiterhin wurde am gleichen Analysenmaterial ein mittlerer Fehler von $\pm 3\%$ für die endgültig gefundenen Ca-Werte errechnet. Dabei hatten 56% eine negative, 40% eine positive und 4% keine Abweichung vom wirklichen Wert. Häufig kam als Wert 1% Abweichung vor, wie *Mayer* angibt, war aber in keiner Weise bevorzugt. Aus dem sehr großen Material ist ersichtlich, daß der mittlere Fehler somit den von *Mayer* angegebenen um ein Mehrfaches übertrifft.

Es ergab sich ferner die theoretisch zunächst unerwartete Erscheinung, daß Phosphatzusatz in Konzentrationen, wie sie physio-

logisch und pathologisch für uns in Betracht kamen, — es wurden die P-Werte von *Elias* und *Weiss* bei Herstellung der Testlösung benutzt, die weit höher sind als die von *György* kürzlich angegebenen — keinen Einfluß auf das Analyseergebnis hatte, der sich über die Fehlergrenze der Methode hinaus erstreckt. Zur Erklärung dieser Erscheinung könnte die Annahme beitragen, daß ein dem Ca-Gehalt mehr als äquivalenter Phosphatgehalt der Lösung stufenweise Besetzung der verschiedenen Phosphatvalenzen mit sich bringen könnte. Diese Ca-Phosphate verschiedener Ionisationsstufen müßten miteinander im Gleichgewicht stehen und infolge der relativ hohen Löslichkeit des primären und auch noch des sekundären Phosphats die Umsetzung mit gleichzeitig anwesendem Oxalation zu praktisch unlöslichem Calciumoxalat bewirken. Möglich wäre aber auch, daß einfach tertiäres Phosphat vorliegt, was unter allen Umständen der Fall sein müßte, wenn eine mehr als dem Phosphatgehalt der Lösung äquivalente Menge Ca-Ion vorhanden ist. In diesem Falle würde bei einer Löslichkeit des Calciumoxalats, die geringer ist als die des Calciumphosphats, auch die Umsetzung in der Richtung auf das Calciumoxalat zu verlaufen.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die de Waardsche Methode für klinische Zwecke durchaus brauchbar ist, wenngleich die Wahl der Methode einer Wägung (nach vorausgehender Veraschung und Fällung) auf der Mikrowage bleibt nach den Grundsätzen der Mikroanalytik, wie sie Emich angibt, und wie sie auch schon von Dienes u. a. in exakter Weise geübt wird.

Literatur:

Dienes, diese Zeitschr. 95, 1919. — *Elias* und *Weiss*, Wiener Arch. f. klin. Med. 1922. — *Emich*, Mikroanalyse in Abderhaldens Handb. — *György*, Jahrb. f. Kinderh. 99, 1922. — *Jansen*, Zeitschr. f. physiol. Chemie 1918. — *Mayer*, Arch. f. Kinderh. 1921. — *de Waard*, diese Zeitschr. 98.

Pigmente im Pferdehaar.

Von

Karl Tutschku.

(Aus der Lehrkanzel für Tierzucht und Geburtshilfe
der Tierärztlichen Hochschule in Wien.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1922.)

Bisher waren in der Literatur über Pigmente im Pferdehaar nur die Melanine bekannt. Auf Anregung von K. Keller, Vorstand der Lehrkanzel für Tierzucht und Geburtshilfe an der Tierärztlichen Hochschule in Wien, stellte ich Untersuchungen auf eventuell vorhandene Lipochrome im Sinne der Theorie über tierische Farbleidung von H. Przibram¹⁾ an, wobei mir H. Przibram die notwendigen Anleitungen gab.

Von je einem mittelgroßen Rappen, einem ausgesprochenen Milchsimmel mit „Krötenmaul und Birkenaugen“, Rotfuchs, typischen Braun, Falb und Isabell wurden die Deckhaare mit Ausnahme von Kopf und Extremitäten, Mähnen und Schweifhaaren abgeschieden, was je $\frac{1}{4}$ kg ergab. Die Haare wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und je $\frac{1}{8}$ kg in Glaszylinder gebracht, ein Liter von einem Gemisch von 75% Alkohol + Äther 9:1 zugesetzt, luftdicht verschlossen und an einem dunklen Orte 10 Wochen ruhig stehen gelassen, wobei die Flüssigkeiten von Fuchs, Braun, Falb und Isabell schon nach 6 Wochen einen gelbgrünen Farbenton annahmen, jene vom Rappen nach 10 Wochen, jene aus den Schimmelhaaren aber ungefärbt blieb. Mit den gewonnenen Extrakten wurden nun die Reaktionen auf Lipochrome angestellt, wobei streng quantitativ mit den Reagenzien Schwefelsäure und Salpetersäure gearbeitet wurde²⁾. Der Extrakt aus den Schimmelhaaren ergab keinerlei Reaktion, während die übrigen fünf Extrakte Lipochromreaktion ergaben. Blieben die Eprouvetten mit den Reaktionen dem direkten Tageslicht ausgesetzt, so verblaßte alsbald sowohl der rotbraune Ring

¹⁾ Arch. f. Entwicklungsmech. 45, 1919.

²⁾ Przibram, Pflügers Arch. 153, 385, 1913.

der Schwefelsäurereaktion als auch der grüne der Salpetersäurereaktion. Beim Verdunsten der Extrakte kam es zum Auskristallisieren der gelösten Stoffe. Die Untersuchung im Polarisationsmikroskop ergab rhombische, doppelbrechende Kristalle, die den für Cholesterin charakteristischen Reaktionen unterworfen wurden. Die *Liebermannsche* Cholestolreaktion war positiv, nach *Salkowski* blieb die Chloroformschicht farblos, die Schwefelsäureschicht zeigte prachtvolle grüne Fluoreszenz. Hiernach gehören die Kristalle zur Gruppe der Cholesterine (diese Versuche sind von Professor *Panzer* kontrolliert worden).

Ferner wurden von allen sechs Haarsorten 5 dkg Haare in Kalilauge aufgelöst und durch Schwarzbandfilter filtriert; beim Rapphaar ergab sich eine sepiaschwarze Flüssigkeit, bei Fuchs und Braun ein satter weinroter Ton, bei Falb und Isabell ein hellgelber bis grünlichgelber, beim Schimmel blieb jede Farbe aus. Die Filtrerrückstände wurden mit dem Alkohol-Äthergemisch extrahiert und Lipochromreaktionen angestellt, die, mit Ausnahme der Schimmelhaare, wieder positiv ausfielen. Am Filtrat fielen die Lipochromproben negativ aus und Lipochrome gingen also bei diesen Versuchen nicht durch Schwarzbandfilter. Je 3 dkg Haare wurden mit 30 volumprozentigen Wasserstoff-superoxyd behandelt, wobei es gelang; bei den Haaren ähnliche Töne wie mit 10% KOH hervorzubringen, doch wurden Isabell und Falb dabei vollkommen weiß. Durch Ammoniak gelang es nicht, Schimmelhaare schwarz zu färben.

Als Kontrollversuche gelangten noch Haare von drei Rappen, drei Grauschimmeln, einem Forellenschimmel, einem Fliegenschimmel und einem Honigschimmel zur Untersuchung auf Lipochromgehalt, wobei sich sämtliche Haare als lipochromhaltig erwiesen, jene des Honigschimmels besonders stark. Ein zweiter „Milchschimmel“ konnte leider nicht ausfindig gemacht werden, so daß sich nicht sagen läßt, ob die von *E. Spiegler*¹⁾ durch Ammoniak erhaltene dunkle Melaninsäure aus Schimmelhaaren auf der Verwendung hautpigmentierter Schimmel oder anderer chemischer Methoden beruht.

¹⁾ Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 4, 40, 1904.

Abbau der Stärke durch ein System: Neutralsalze + Aminosäuren + Pepton.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Hugo Haehn.

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1922.)

Meine Arbeiten über die Tyrosinase¹⁾ hatten die große Bedeutung der Neutralsalze für dieses Enzym klargelegt. Da aus den Veröffentlichungen anderer Autoren wie *Starkenstein* und *Biedermann* auch die Wichtigkeit verschiedener Salze für die Amylase hervorging, von *Biedermann* später selbst das Neutralsalz als Aktivator²⁾ für das Amylasezymogen angesprochen wurde, so versuchte ich, meine Erfahrungen von der Tyrosinase auf die Kartoffelamylase zu übertragen. Ich wollte durch Dialyse bzw. Ultrafiltration die Salze entfernen und so den organischen Teil des Enzyms inaktivieren. Bei diesen Aktivierungsversuchen machte ich alsdann die seltsame Beobachtung, daß man *mit Hilfe von Neutralsalzen allein schon, also ohne organische Komponente, den Abbau der Stärke bis zum Zucker bewerkstelligen konnte*. Ich setzte infolgedessen zunächst meine ursprünglich gestellte Aufgabe³⁾ zurück und folgte vor der Hand diesem neuen Phänomen.

Beim Verfolgen dieser Idee fand ich die äußerst interessante Literaturstelle von *W. Biedermann*, die besagt, daß die geglühte Speichelamylaseasche allein schon Stärke abzubauen vermag. In der sich daran anschließenden Diskussion mit anderen Forschern ließ *Biedermann* diese Idee wieder fallen und erklärte sein damaliges Experiment durch Amylasespuren, die ev. der Stärke oder den be-

¹⁾ *H. Haehn*, Diese Zeitschr. 105, 169, 1920; „Fermentforschung“ IV, S. 301, 1920.

²⁾ *W. Biedermann*, „Fermentforschung“ IV, S. 258—300, 1920.

³⁾ Über diese inzwischen beendeten Versuche soll in Kürze ausführlich berichtet werden.

nutzten Reagenzgläsern noch anhafteten¹⁾. Mittlerweile ist *Biedermann* dank weiterer umfassenderer Experimente über die Amylase wieder zu seiner alten Anschauung, daß Salze allein schon Stärke verzuckern können, zurückgekehrt. Er hält die Luftzufuhr für unbedingt notwendig und baut z. B. mit Hilfe von Chlornatrium im Beisein von Phosphaten und Luftsauerstoff, unter Beihilfe von Glykokoll, die Stärke zu Zucker in kurzer Zeit ab²⁾.

Ich war also zur gleichen Zeit zu demselben Resultat gelangt jedoch, wie die Arbeiten zeigen werden, bei etwas anderer Arbeitsweise. Da der Befund so unerwartet ist, so war es mein größtes Bestreben, vor der Veröffentlichung erst umfangreiches Material zu sammeln, um nicht Täuschungen zum Opfer zu fallen. Obgleich bis heute mehr als 90 große Versuchsreihen vorliegen, so konnten noch nicht alle Reaktionsbedingungen ausgekundschaftet werden, um immer durchgreifenden Erfolg zu haben. Bei den ersten Versuchen hatten wir eine glückliche Hand, denn die Experimente verliefen nach Wunsch. Jedoch bald stellten sich Schwierigkeiten in den Weg, die, wie gesagt, bis heute noch nicht alle überwunden werden konnten. Da das Material der Tastversuche stark angeschwollen ist, so bringen wir bereits heute die vorläufigen Ergebnisse. Der Ausbau der Arbeit muß nun systematisch erfolgen und von verschiedenen Gesichtspunkten aus geleitet werden. Bei der Behandlung von Aufgaben wie die vorliegende, bei denen z. Z. keine vollständige Lösung mitgeteilt werden kann, ist das experimentelle Material wichtiger als längere theoretische Spekulationen, weshalb hier mehr tabellarisches Material als sonst üblich gebracht werden soll.

A. Chemische Einflüsse beim Abbau der Stärke.

Von dem Gedanken ausgehend, daß in der Natur oft Salzgemische reagieren — ich hatte das bei der Tyrosinasereaktion beobachtet, *Neuberg*³⁾ bei dem Ersatz des Ko-Enzyms der Hefe durch eine Mischung von Salzen verschiedener Ketosäuren —, so benutzte ich hier eine Mischung aus gleichen Teilen m/10 Chlorkalium-, m/10 Chlornatrium- und m/10 Chlorcalciumlösung, um damit Stärke zu verzuckern. Blieb das Reaktionsgemisch 22 Stunden bei 37° stehen, so zeigte die Jodprobe je nach der zugefügten Salzmenge teilweisen oder vollständigen Abbau der Stärke. Daß in dem mit Jod ge-

¹⁾ *W. Biedermann*, „Fermentforschung“ III, S. 70, 1919; Münchener med. Wochenschrift 1922; Nr. 39, S. 1402—1404; diese Zeitschr. 129, 582, 1922.

²⁾ Privatmitteilung des Herrn Geheimrat *Biedermann*. Eine Abhandlung ist z. Z. im Druck.

³⁾ *C. Neuberg*, diese Zeitschr. 71, 135, 1915.

prüften gelben Reaktionsgemisch auch Zucker entstanden war, bewies der positive Ausfall der *Fehling* schen Probe.

Es war von vornherein klar, daß ein wichtiger Faktor der jeweilige Zustand des Stärkemoleküls sein müsse. Ich hatte eine lösliche Stärke von *Kahlbaum*, mit A bezeichnet, zur Verfügung, dann ein ebensolches Präparat, vor Jahren selbst mit Salzsäure hergestellt und mit C bezeichnet, und eine gewöhnliche Kartoffelstärke. Zum Ansatz kamen immer $\frac{1}{2}$ ccm einer einprozentigen Lösung, die nach Zusatz von 0,1 bzw. 0,2, 0,3 (usw.) ccm Neutralsalzmischung auf 10 ccm im Reagenzrohr mit Wasser aufgefüllt wurde. Die Versuchsanordnung geht aus Tabelle I hervor. Wir sehen zunächst in Gläschen A von Versuch 1 die Kontrolle, die eine Mischung von 0,5 ccm Stärkelösung C (1 %) mit 9,5 ccm Wasser vorstellt. Nach 22 stündiger Einwirkung im Brutschrank bei 37° erfolgte auf Zusatz von einem Tropfen n/10 Jodlösung Blaufärbung. In Gläschen 1—5 war die Stärke vollständig abgebaut worden, und zwar durch Zusatz der Neutralsalzmischung Chlornatrium, Chlorkalium und Chlorcalcium. Wir sehen aus Versuch 1, daß schon 0,1 ccm Salzmischung zum vollständigen Abbau ausreichte. Wurde mehr Salzlösung verwendet, z. B. 0,7 ccm, so erfolgte die Hydrolyse nur bis zum Dextrin. Eine Steigerung bis 0,9 bzw. 1,0 ccm störte die Reaktion. Wir schließen hieraus, daß es auf das richtige Verhältnis von Salz zur Stärkelösung ankommt. Diese Beobachtung wurde sehr oft, auch bei den anderen Mischungen gemacht, und man gewinnt den Eindruck, daß die kleinsten Salz mengen oft am wirksamsten waren. Ein zweiter Versuch auf Tabelle I zeigt ein ähnliches Resultat, auch die Versuche auf Tabelle II. Die etwa 90 Versuchsreihen, mit verschiedenen Stärkesorten angesetzt, führten zu folgendem Resultat: Nur Stärke C ist für den Abbau durch Neutralsalze besonders geeignet. Von 20 Experimenten glückten allerdings nur die Hälfte. Die negativ verlaufenen Versuche hatten wahrscheinlich die Stärke C nicht in der richtigen Dispersion. Stärke A ist für diesen Abbau ungeeignet. Von 60 Versuchsreihen waren nur acht positiv ausgefallen, und zwar die meisten recht schlecht. Die Kartoffelstärke lieferte in allen fünf Fällen überhaupt keinen Abbau.

Für den negativen Ausfall der Versuche konnten zunächst zwei Gesichtspunkte ausschlaggebend sein. Einmal war nicht immer mit dem gleichen Kolloidzustande der Stärkelösung zu rechnen und vielleicht, damit im Zusammenhang stehend, wäre eine verschiedene Hydratation der Salzionen (s. weiter unten) möglich gewesen. Da nun die Experimente mit den natürlich vorkommenden Amylasen erwiesen hatten, daß eine äußerst peinlich genaue Vorbereitung der Stärkelösung nicht notwendig ist, so hoffte ich in meinem Falle die

Tabelle I.

Abbau einer Stärkelösung durch ein Gemisch von Neutralsalzen.

Die abgewogene, in wenig Wasser aufgeschlämmte lösliche Stärke C wurde in siedendes Wasser eingetragen und dann so weit aufgefüllt, damit eine 1proz. Lösung entstand. Zur Verwendung kamen ferner m/10 Lösung von KCl, NaCl und CaCl₂. Ein Gemisch dieser drei Salzlösungen wird mit Salzgemisch I bezeichnet. Alle Lösungen frisch bereitet. Wirkungszeit 22 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung C 1% .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I . . .	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau	hellgelb			gelb bräun- lich			rotbraun		violett	
Versuch 2.											
Stärkelösung C 1% .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I . . .	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau	dunkel weinrot			gelb	hellgelb		rotbraun			

Tabelle II.

Abbau einer Stärkelösung durch ein Gemisch von Neutralsalzen.

Versuchsbedingungen wie Tabelle I. 20 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau			violett		rotviolett			braunrot		
Versuch 2.											
Stärkelösung A 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau			rotviolett		violett					

Salze durch einen geeigneten Zusatz gefügsam für meine Reaktion zu machen. Bekanntlich geben Aminosäuren mit Neutralsalzen nach P. Pfeiffer¹⁾ Doppelverbindungen, und weil auf diese Art einmal eine Vergrößerung des Salzmoleküls zustande kommt, dann aber auch

¹⁾ P. Pfeiffer u. J. v. Modelski, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 329, 1912; 85, 1, 1913; P. Pfeiffer u. Fr. Wütka, Ber. 48, 1041, 1289, 1915; P. Pfeiffer, J. Würzler u. Fr. Wütka, Ber. 48, 1938, 1915.

auf diese Weise das Salz in den Kolloidzustand übergeführt wird — wässrige Aminosäurelösungen zeigen ja das Tyndallphänomen —, so war eine Möglichkeit gegeben, durch Zusatz dieser Ampholyte vielleicht zum Ziele zu kommen. Ich ließ also auf meine Stärkelösung das Gemisch von Neutralsalzen und gleichzeitig ein Gemisch von Aminosäuren (m/10 Alanin und m/10 l-Leucin) einwirken und beobachtete in der Tat einen intensiveren Stärkeabbau. Es wurde konstatiert, daß nicht nur die lösliche Stärke C, sondern auch die lösliche Stärke A und sogar die gewöhnliche Kartoffelstärke von dem Salz-Aminosäuregemisch hydrolysiert werden konnten. Bemerkte sei ausdrücklich, daß, um den Effekt hier recht deutlich zu zeigen, in den hier zu besprechenden Experimenten nur solche Versuchsreihen aus dem großen Versuchsmaterial ausgewählt wurden, bei denen die Neutralsalzmischung allein versagt hatte. Von 20 Experimenten verliefen zehn im gewünschten Sinne; fünf Versuchsreihen, die mit anderen Aminosäuregemischen, als oben angegeben wurde, angestellt waren, verliefen negativ, und von den letzten fünf Versuchsreihen ist die Ursache des negativen Ausfalles ihres Resultates noch nicht sicher erwiesen. Als günstiges Aminosäuregemisch hatte sich bis jetzt ein

Tabelle III.

Abbau der Stärke durch gleichzeitige Wirkung von Neutralsalzen und Aminosäuren.

Stärkelösung und Salzlösung wie auf Tabelle I bereitet. Aminosäuregemisch m/10 Alanin und m/10 Leucin. Wirkungszeit 20 Stunden bei 37°.

Mischung I: Gleiche Anzahl von cem m/10 KCl, m/10 NaCl, m/10 CaCl₂.
 " II: " " " " " m/10 Alanin, m/10 Leucin.
 " III: " " " " " von Mischung I und II.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 2.											
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung II	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 3.											
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung III	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau			blauviolett			braunrot				

Die Reaktion 43 Stunden lang bei 45 bis 50° gehen lassen. Versuch 4 zeigt totalen Abbau der Stärke A. Merkwürdig ist, daß zwei in derselben Reihe liegende Gläschen desselben Versuches noch keine vollkommene Hydrolyse gaben. Dies ist in Versuch 3, der keine steigenden, sondern nur gleiche Mengen von Aminosäuren erhalten hat, noch auffälliger. Hier beobachten wir fast in der ganzen Reihe alternierend blau und gelb. Diese Versuche könnten auf die Not-

Tabelle IV

Abbau der Stärke durch gleichzeitige Wirkung von Natriumcyanid und Aminosäuren

Reaktionszeit 43 Stunden bei 45 bis 50° sonst alles wie auf Tabelle III.

Reaktionsgemisch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	von	von	von	von	von	von	von	von	von	von
Versuch 1										
Stärke/Lösung A 1 %	0.5	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5	0.5	0.5	0.5
Mischung I	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Wasser	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	0.7	0.5
Färbung auf J-Zusatz										
Versuch 2										
Stärke/Lösung A 1 %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Mischung I	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Mischung II	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Wasser	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	0.7	0.5
Färbung auf J-Zusatz										
Versuch 3										
Stärke/Lösung A 1 %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Mischung I	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Mischung II	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Wasser	0.5	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Färbung auf J-Zusatz	blau	hell gelb	blau	hellgelb	hellgelb	blau	hell gelb	blau	hellgelb	hellgelb
Versuch 4										
Stärke/Lösung A 1 %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Mischung I	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Mischung II	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Wasser	0.5	0.3	0.1	0.9	0.7	0.5	0.3	0.1	0.9	0.7
Färbung auf J-Zusatz	blau	hell gelb	rot	hellgelb	blau		hellgelb		hellgelb	

kommen hier mit dem Salz-Aminosäuregemisch bis zum Endziel, wenn wir die Reaktion 43 Stunden lang bei 45 bis 50° gehen lassen. Versuch 4 zeigt totalen Abbau der Stärke A. Merkwürdig ist, daß zwei in derselben Reihe liegende Gläschen desselben Versuches noch keine vollkommene Hydrolyse gaben. Dies ist in Versuch 3, der keine steigenden, sondern nur gleiche Mengen von Aminosäuren erhalten hat, noch auffälliger. Hier beobachten wir fast in der ganzen Reihe alternierend blau und gelb. Diese Versuche könnten auf die Not-

wendigkeit eines günstigen Verhältnisses von Neutralsalz zu Aminosäure hindeuten. Wiederholungen gaben ein ähnliches Resultat. Vollständiger Abbau bis zur Gelbfärbung trat jedoch bei den anderen Versuchsreihen in den wenigsten Fällen ein, aber immer ließ sich der steigende Einfluß des Aminosäuregemisches konstatieren.

Fast zur gleichen Zeit wie ich hatte *W. Biedermann* mit Hilfe von Chlornatrium und Glykokoll Stärke hydrolysiert, jedoch hatte er damals noch den Effekt in der Hauptsache der Aminosäure zugeschrieben. Daß Salze allein den Prozeß bewerkstelligen können, war zu jener Zeit von ihm noch nicht erkannt worden¹⁾.

Es war interessant zu erfahren, ob andere Aminosäuregemische eine ebensolche Wirkung wie die von uns benutzten auslösen. Mit den folgenden zwei Kombinationen Glykokoll + Tyrosin, Leucin + Isoleucin + Glykokoll + Alanin + Tyrosin konnten trotz Variation der Versuche keine Erfolge erzielt werden.

Diese noch wenig befriedigenden Resultate mit dem Neutralsalz-Aminosäuregemisch erwecken den Wunsch, noch andere Aktivatoren in das Bereich der Untersuchungen zu ziehen. Es war naheliegend, an niedere Polypeptide, Peptone und Albumosen zu denken. Einige Versuche, die mit Leucylglycin + Alanin + Leucin + dem genannten Neutralsalzgemisch angesetzt wurden, ergaben zum Teil positive, zum Teil negative Ergebnisse.

Besser fielen die Versuche mit einer Albumose (Aschegehalt = 5,6 %) der Firma *R. Schering* aus. Es liegen sieben Versuchsreihen mit verschiedenen Stärkesorten vor, die alle ein positives Resultat ergaben. Es sei von vornherein bemerkt, daß nicht alle Versuche gleichmäßig ausfielen und daß wieder nicht alle den totalen Abbau bis zur Maltose bzw. Glukose bewerkstelligten. Hervorzuheben ist ferner, daß sowohl die lösliche Stärke A als auch die gewöhnliche Kartoffelstärke, wenn letztere auch nur in 0,5 proz. Konzentration angewandt wurde, für das Experiment geeignet waren. Tabelle V zeigt die Anordnung, wie die Versuchsreihen mit ihren Kontrollen stets ausgeführt wurden. Zur Wiedergabe kam ein Versuch, der besonders den Einfluß der Albumose zeigen sollte. Bei den anderen Experimenten dieser Anordnung war manchmal schon Abbau durch Neutralsalze allein, manchmal durch Kombination zweier Komponenten des Reagenzgemisches eingetreten. Als Substrat der Versuche von Tabelle V diente Kartoffelstärke, die kleisterartig aufgequollen wurde. Der Versuch 1 zeigt, daß Neutralsalze allein keinen Abbau bewerkstelligen konnten, ebenso Aminosäuren allein (2), end-

¹⁾ *W. Biedermann*, Extrait des Archives Néerlandaises de Physiologie de l'Homme et des Animaux, tome VII, p. 151, 1922.

Tabelle V.

Abbau der Stärke durch das System: Neutralsalz + Aminosäuren + Albumose.
 Salzlösung: Gleiche Anzahl von ccm m/10 KCl, m/10 NaCl, m/10 CaCl₂.
 Aminosäuregemisch: Gleiche Anzahl von ccm m/10 Alanin, m/10 l-Leucin.
 Albumose (Schering) in 1 proz. Lösung. $\frac{1}{3}$ proz. Kartoffelstärkelösung.
 Wirkungszeit: 22 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 2.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 3.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 4.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,3	9,1	8,9	8,7	8,5	8,3	8,1	7,9	7,7	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau	violett									
Versuch 5.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,0	7,9	7,8	7,7	7,6	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 6.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,0	7,9	7,8	7,7	7,6	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 7.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,3	8,1	7,9	7,7	7,5	7,3	7,1	6,9	6,7	6,5
Färbung auf J-Zusatz	blau	gelb	jodbraun	jodbraun	jodbraun	violett	gelb	gelb	violett	violett	violett

lich Albumosen allein (3). Kamen die Aminosäuren mit der Salzlösung gleichzeitig in Reaktion, so erfolgte eine geringe Hydrolyse: die Stärkelösung färbte sich mit Jod violett (4). Jedoch die Mischung von den Salzen mit Albumosen (5) oder das Aminosäure-Albumosengemisch (6) verhielten sich passiv. Kamen dagegen alle Komponenten gleichzeitig zur Entfaltung, so war totaler Abbau in verschiedenen Reagenzgläsern eingetreten (7).

Mein Bestreben zielte dahin, eine ganz energische Stärkehydrolyse mit dem Salzgemisch zu erreichen. Außerdem war ein nie versagendes Reagenzgemisch sehr erwünscht. Als „Aktivator“ für das Aminosäure-Neutralsalzgemenge kam zunächst das leicht zugängliche Pepton „Witte“ (von *Kahlbaum* bezogen) in Frage. Von etwa 20 ähnlich angesetzten Stärkeabbauversuchen fielen fast alle Versuche positiv aus. Leider wurde auch hier nicht bei allen Experimenten die Zuckerstufe erreicht; oft waren noch einige Reagenzgläser rot bis rosa gefärbt. In manchen Reihen fehlte überhaupt die letzte Stufe. Aber immer wurde beobachtet, daß die stärkste Hydrolysewirkung von dem Hauptgemisch ausging, wenn auch manchmal die Salze allein oder das Salz-Aminosäuregemisch teilweisen Abbau verrieten. Das Hauptgemisch erwies sich so kräftig, daß alle Stärkesorten, sogar Kartoffelstärke, zum Kleister aufgequollen, angegriffen wurden. Am besten eignete sich jedoch die Stärke A in 1 proz., und die Kartoffelstärke in $\frac{1}{2}$ proz. Lösung. Es sei hier gleich der Einwand vorweggenommen, daß nicht etwa der Erfolg bei der Kartoffelstärke der eventuell noch anhaftenden Diastase zuzuschreiben ist. Ein Blick auf die zahlreichen Kontrollreihen der Tabelle VII lehrt, daß in dieser Anordnung sehr viele Einzelversuche hätten Abbau zeigen müssen, da sich das eventuell vorhandene Zymogen sehr oft mit „Aktivatoren“ (Salze, Aminosäuren) in Mischung befand. Im übrigen war auch die Stärkelösung gründlich gekocht worden. Die Mehrzahl der Versuche verlief bei 37°, jedoch auch Temperaturen von 45 bis 50° führten zum Ziel. Es kam auch zweimal vor, daß in den Versuchsreihen schon das Pepton allein stark abbaute, sogar besser als das Hauptgemisch. Das ist andererseits bei dem Aschegehalt des Peptons (1,4 %) nicht gerade verwunderlich, wenn man noch dazu annimmt, daß sich die Stärke auch mal in einem recht geeigneten Kolloidzustande befinden konnte. Man sieht hieraus jedenfalls, wie kompliziert die Sache liegt. In manchen Fällen reichte scheinbar der eigene Salzgehalt nicht aus und es wurde die Wirkung erst auf Salzzusatz erkenntlich.

Auf Tabelle VI finden wir in Versuch 1 wieder die Passivität des Neutralsalzgemisches (KCl , $NaCl$, $CaCl_2$) in 1 proz. Stärkelösung. In der gleichen Weise verhält sich das Aminosäuregemisch Alanin + Leucin (Versuch 2). Pepton, in 1 proz. Lösung der Stärke zu-

Zusammenfassung.

Es gelingt, durch Anwendung geeigneter Pneumokokkenstämme Chininverdünnungen bis 1 : 320 000 zu bestimmen, wenn man die Entfärbung des Methylenblaus durch Pneumokokken bzw. deren Hemmung durch Chininlösungen als Indikator anwendet. Die meisten Pneumokokkenstämme vermögen nur in einer Verdünnung 1 : 40 000 bis 1 : 80 000 des salzsauren Chinins in ihrem Reduktionsvermögen Methylenblau gegenüber beeinträchtigt zu werden. Doch ermöglicht es die Vorbehandlung der Pneumokokken während einiger Stunden bei Eistemperatur, auch höhere Verdünnungen des Alkaloids zu bestimmen. Das Reduktionsvermögen bei Zimmertemperatur gestattet, Chininlösungen um 1 : 10 Millionen herum, jedoch nur ungenau, festzustellen.

Literatur.

Hartmann und Zila, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **83**, 1918. — *Rona*, diese Zeitschr. **111**, 118, 121, 1921. — *Morgenroth und Ginsberg*, Berlin. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 46; 1913, Nr. 18. — *Retzlaff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1921. — *Schnabel*, diese Zeitschr. **108**, 1920.

Zur Kritik der de Waardschen Mikromethode.

Von

Kurt Blühdorn und Grete Genck.

(Aus der Universitätskinderklinik in Göttingen.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1922.)

Die von *de Waard* angegebene Methode zur Bestimmung des Calciums in kleinen Mengen Blutserums durch direkte Fällung als Oxalat ist wegen der relativ geringen notwendigen Serummenge, der Einfachheit ihrer Handhabung und der billig zu beschaffenden Apparatur allgemein in der Pädiatrie angewandt worden. Bezüglich Einzelheiten der Methodik verweisen wir auf die Originalmitteilung *de Waards* (diese Zeitschr. 98).

De Waard prüfte seine Methode gegen eine Mikromethode, die er für das Gesamtblut angegeben hatte und die in trockener Veraschung des Blutes und Fällung des Calciums als Oxalat in essigsaurer Lösung und nachfolgender Titration gegen $n/100 \text{ KMnO}_4$ bestand, einer Methodik, die, abgesehen von der Veraschung, in gleicher Weise wie die Verarbeitung des Calciumoxalats im Serum direkt gehandhabt wurde. Diese Fällung in essigsaurer Lösung ist allerdings in der analytischen Chemie als nicht ganz zuverlässig fallen gelassen. Die Nachprüfung ist demnach auch nicht ganz exakt. *R. Mayer*, der die Methode nachprüfte, fand 1% Fehler. Aus seinen Darlegungen ist nicht ersichtlich, in welcher Weise er die Nachprüfung vorgenommen hat. Den Einwand von *Jansen*, daß nur der ionisierte Teil des Ca gefällt würde, widerlegte *de Waard* durch die Feststellung, daß ionisierter wie nicht ionisierter Anteil des Ca im Serum miteinander im Gleichgewicht stehen, daß also, falls der ionisierte Anteil durch das Ausfällen geringer wird, ein entsprechender Teil des nicht ionisierten in freie Ionenform übergeht, wieder ausgefällt wird und so fort bis zum Verschwinden des gesamten Ca aus dem Serum. Wir können dies nur bestätigen, da wir in dem über dem Oxalatniederschlag befindlichen Serum und überschüssigem Oxalat nach feuchter Veraschung des Serumeiweißes nie Ca nachweisen konnten.

De Waard macht in seiner ersten Mitteilung über die Calciumbestimmung im Gesamtblut darauf aufmerksam, daß sowohl das Magnesium wie die Phosphorsäure einer direkten Fällung des Ca mit Oxalsäure im Wege stünden. Die Inklusion von Magnesiumoxalat in Calciumoxalat ist verschwindend gering, wie *de Waard* an Versuchen nachgewiesen hat, so daß sie als Fehlerquelle nicht ernstlich in Betracht kommt. Dagegen kommt er auf den Einfluß der Phosphorsäure bei der Bestimmung des Ca im Serum direkt nicht mehr zurück, und der theoretische Einwand, daß ein Teil des Ca als tertiäres Phosphat bei Zufügung von OH-Ionen ausfallen könnte und dadurch für die Titration der Oxalsäure verloren ginge, bleibt bestehen.

Es schien uns vor allem auf Grund dieser Überlegung ratsam, die Methode nochmals einer genauen Prüfung zu unterziehen. Wäre der P-Gehalt des Serums konstant, so müßten, falls die Phosphorsäure einen Fehler verursacht, die Werte immerhin relativ brauchbar sein. Aber z. B. gerade bei einem Krankheitsbild wie der Spasmodie, wo uns vor allem der Kalkstoffwechsel interessiert, wissen wir, daß der Gehalt an PO_4''' sehr wechselt (*Elias-Weiss*), und so könnte leicht, falls der theoretische Einwand zu Recht besteht, bei Anwendung der Methode ein nicht unerheblicher Fehler mit unterlaufen.

Da uns eine Mikrowage zur Nachprüfung der Methodik nicht zur Verfügung stand, wurden Testlösungen von bestimmtem Ca-Gehalt hergestellt. Reines, mehrfach unter Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen (doppelt destilliertes H_2O) umgefälltes CaCO_3 , dessen Reinheit überdies noch gravimetrisch nachgeprüft wurde, wurde nach dem Abwiegen in das Chlorid übergeführt, so daß die erhebliche Wägefehler verursachende Hygroskopie des CaCl_2 vermieden wurde. Um den Einfluß von Phosphationen zu bestimmen, wurden bekannte wechselnde Mengen von sekundärem Alkaliphosphat hinzugefügt. Es kamen folgende Testlösungen zur Verarbeitung:

1. 12 mg Ca ad 100 ccm.
2. 12,5 mg P }
12 mg Ca } ad 100 ccm.
3. 12 mg Ca }
7,5 mg P } ad 100 ccm.
4. 7,85 mg P ad 100 ccm }
5. 12,5 mg P ad 100 ccm } als Zusatz zu Serum.

In diesen Lösungen wurde der Gehalt an Ca nach *de Waard* bestimmt. Außerdem kamen Sera von verschiedenen Tieren (Rind, Hammel, Schwein) zur Untersuchung. Bei Handhabung der Methodik nach der Originalvorschrift stellte sich folgendes als Fehlerquelle heraus: Eine ganz geringe Menge Serumeiweiß — mit den uns zu Gebote stehenden Mitteln nicht quantitativ bestimmbar — wurde im

Oxalatniederschlag eingeschlossen, wodurch natürlich ein geringes Quantum $n/100 \text{ KMnO}_4$ reduziert wurde. Diese Eiweißmenge wurde größer, je später man nach der Entnahme das Blut verarbeitete. Deshalb ist die Verwendung ganz frischen Blutes anzuraten. Ferner kam ein Teil des Niederschlages oft nicht in die Spitze des Zentrifugenglases, sondern blieb an der seitlichen Wand haften. Es kam dann beim Abheben der über dem Niederschlag befindlichen Flüssigkeit dadurch zu einer Schleierbildung, hervorgerufen durch Aufwirbeln der an der schrägen Wand haftenden Niederschlagsteilchen durch die Flüssigkeitsbewegung, und ein Teil des Calciumoxalats wurde unvermeidlich weggehoben, oder aber das Auswaschen konnte nicht sachgemäß durchgeführt werden, um diesen Kalk nicht mit in die Pipette zu bekommen. Bei einiger Übung wurde dieser Fehler natürlich geringer, aber auch dann noch fielen einige Titrationen (manchmal von vier eine) ganz aus der Reihe heraus und mußte von vornherein verworfen werden. Kontrollbestimmungen sind aus diesem Grunde unerlässlich. Die Schleierbildung war zeitweise besonders stark bei Anwendung der Testlösungen, trat aber ab und zu auch beim Serum auf, ohne daß ein Grund dafür gefunden wurde. Es lag die Annahme nahe, daß infolge Mangels an Kristallisationszentren in der Lösung etwaige Rauigkeiten in der Glaswand (obgleich nur Jenenser Glas zur Verwendung kam) die Kristallisation hier hervorriefe. Um etwaige derartige Einflüsse herabzumindern oder zu beseitigen, wurden kolloide Lösungen in verschiedenen Konzentrationen (Kaolin, Stärke) hinzugefügt, deren Teilchen die Kristallisationskeime (Kernzahl) vermehren sollten. Es trat jedoch keine bemerkbare Besserung ein. Bessere Übereinstimmungen wurden erzielt, als man der Testlösung Serum, dessen Ca-Wert nach *de Waard* vorher bestimmt war, zusetzte.

Aus einem Analysenmaterial von über 120 Analysen konnte eine mittlere Titrationsgenauigkeit (Abweichung der einzelnen Titrationen und Bestimmungen voneinander) von $\pm 2,1\%$ errechnet werden, wobei die maximale Abweichung 5%, die minimale 0% betrug. Die manchmal auftretende große Abweichung ist wohl auf das mehr oder weniger große Anhaften des Niederschlags am Rande zurückzuführen. Weiterhin wurde am gleichen Analysenmaterial ein mittlerer Fehler von $\pm 3\%$ für die endgültig gefundenen Ca-Werte errechnet. Dabei hatten 56% eine negative, 40% eine positive und 4% keine Abweichung vom wirklichen Wert. Häufig kam als Wert 1% Abweichung vor, wie *Mayer* angibt, war aber in keiner Weise bevorzugt. Aus dem sehr großen Material ist ersichtlich, daß der mittlere Fehler somit den von *Mayer* angegebenen um ein Mehrfaches übertrifft.

Es ergab sich ferner die theoretisch zunächst unerwartete Erscheinung, daß Phosphatzusatz in Konzentrationen, wie sie physio-

der Schwefelsäurereaktion als auch der grüne der Salpetersäurereaktion. Beim Verdunsten der Extrakte kam es zum Auskristallisieren der gelösten Stoffe. Die Untersuchung im Polarisationsmikroskop ergab rhombische, doppelbrechende Kristalle, die den für Cholesterin charakteristischen Reaktionen unterworfen wurden. Die *Liebermannsche* Cholestolreaktion war positiv, nach *Salkowski* blieb die Chloroformschicht farblos, die Schwefelsäureschicht zeigte prachtvolle grüne Fluoreszenz. Hiernach gehören die Kristalle zur Gruppe der Cholesterine (diese Versuche sind von Professor *Panzer* kontrolliert worden).

Ferner wurden von allen sechs Haarsorten 5 dkg Haare in Kalilauge aufgelöst und durch Schwarzbandfilter filtriert; beim Rapphaar ergab sich eine sepiaschwarze Flüssigkeit, bei Fuchs und Braun ein satter weinroter Ton, bei Falb und Isabell ein hellgelber bis grünlichgelber, beim Schimmel blieb jede Farbe aus. Die Filterrückstände wurden mit dem Alkohol-Äthergemisch extrahiert und Lipochromreaktionen angestellt, die, mit Ausnahme der Schimmelhaare, wieder positiv ausfielen. Am Filtrat fielen die Lipochromproben negativ aus und Lipochrome gingen also bei diesen Versuchen nicht durch Schwarzbandfilter. Je 3 dkg Haare wurden mit 30 volumprozentigen Wasserstoff-superoxyd behandelt, wobei es gelang; bei den Haaren ähnliche Töne wie mit 10% KOH hervorzubringen, doch wurden Isabell und Falb dabei vollkommen weiß. Durch Ammoniak gelang es nicht, Schimmelhaare schwarz zu färben.

Als Kontrollversuche gelangten noch Haare von drei Rappen, drei Grauschimmeln, einem Forellenschimmel, einem Fliegenschimmel und einem Honigschimmel zur Untersuchung auf Lipochromgehalt, wobei sich sämtliche Haare als lipochromhaltig erwiesen, jene des Honigschimmels besonders stark. Ein zweiter „Milchschimmel“ konnte leider nicht ausfindig gemacht werden, so daß sich nicht sagen läßt, ob die von *E. Spiegler*¹⁾ durch Ammoniak erhaltene dunkle Melaninsäure aus Schimmelhaaren auf der Verwendung hautpigmentierter Schimmel oder anderer chemischer Methoden beruht.

¹⁾ Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 4, 40, 1904.

**Abbau der Stärke
durch ein System: Neutralsalze + Aminosäuren + Pepton.**

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Hugo Haehn.

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1922.)

Meine Arbeiten über die Tyrosinase¹⁾ hatten die große Bedeutung der Neutralsalze für dieses Enzym klargelegt. Da aus den Veröffentlichungen anderer Autoren wie *Starkenstein* und *Biedermann* auch die Wichtigkeit verschiedener Salze für die Amylase hervorging, von *Biedermann* später selbst das Neutralsalz als Aktivator²⁾ für das Amylasezymogen angesprochen wurde, so versuchte ich, meine Erfahrungen von der Tyrosinase auf die Kartoffelamylase zu übertragen. Ich wollte durch Dialyse bzw. Ultrafiltration die Salze entfernen und so den organischen Teil des Enzyms inaktivieren. Bei diesen Aktivierungsversuchen machte ich alsdann die seltsame Beobachtung, daß man *mit Hilfe von Neutralsalzen allein schon, also ohne organische Komponente, den Abbau der Stärke bis zum Zucker bewerkstelligen konnte*. Ich setzte infolgedessen zunächst meine ursprünglich gestellte Aufgabe³⁾ zurück und folgte vor der Hand diesem neuen Phänomen.

Beim Verfolgen dieser Idee fand ich die äußerst interessante Literaturstelle von *W. Biedermann*, die besagt, daß die geglühte Speichelamylaseasche allein schon Stärke abzubauen vermag. In der sich daran anschließenden Diskussion mit anderen Forschern ließ *Biedermann* diese Idee wieder fallen und erklärte sein damaliges Experiment durch Amylasespuren, die ev. der Stärke oder den be-

¹⁾ *H. Haehn*, Diese Zeitschr. 105, 169, 1920; „Fermentforschung“ IV, S. 301, 1920.

²⁾ *W. Biedermann*, „Fermentforschung“ IV, S. 258—300, 1920.

³⁾ Über diese inzwischen beendeten Versuche soll in Kürze ausführlich berichtet werden.

nutzten Reagenzgläsern noch anhafteten¹⁾. Mittlerweile ist *Biedermann* dank weiterer umfassenderer Experimente über die Amylase wieder zu seiner alten Anschauung, daß Salze allein schon Stärke verzuckern können, zurückgekehrt. Er hält die Luftzufuhr für unbedingt notwendig und baut z. B. mit Hilfe von Chlornatrium im Beisein von Phosphaten und Luftsauerstoff, unter Beihilfe von Glykokoll, die Stärke zu Zucker in kurzer Zeit ab²⁾.

Ich war also zur gleichen Zeit zu demselben Resultat gelangt jedoch, wie die Arbeiten zeigen werden, bei etwas anderer Arbeitsweise. Da der Befund so unerwartet ist, so war es mein größtes Bestreben, vor der Veröffentlichung erst umfangreiches Material zu sammeln, um nicht Täuschungen zum Opfer zu fallen. Obgleich bis heute mehr als 90 große Versuchsreihen vorliegen, so konnten noch nicht alle Reaktionsbedingungen ausgekundschaftet werden, um immer durchgreifenden Erfolg zu haben. Bei den ersten Versuchen hatten wir eine glückliche Hand, denn die Experimente verliefen nach Wunsch. Jedoch bald stellten sich Schwierigkeiten in den Weg, die, wie gesagt, bis heute noch nicht alle überwunden werden konnten. Da das Material der Tastversuche stark angeschwollen ist, so bringen wir bereits heute die vorläufigen Ergebnisse. Der Ausbau der Arbeit muß nun systematisch erfolgen und von verschiedenen Gesichtspunkten aus geleitet werden. Bei der Behandlung von Aufgaben wie die vorliegende, bei denen z. Z. keine vollständige Lösung mitgeteilt werden kann, ist das experimentelle Material wichtiger als längere theoretische Spekulationen, weshalb hier mehr tabellarisches Material als sonst üblich gebracht werden soll.

A. Chemische Einflüsse beim Abbau der Stärke.

Von dem Gedanken ausgehend, daß in der Natur oft Salzgemische reagieren — ich hatte das bei der Tyrosinasereaktion beobachtet, *Neuberg*³⁾ bei dem Ersatz des Ko-Enzyms der Hefe durch eine Mischung von Salzen verschiedener Ketosäuren —, so benutzte ich hier eine Mischung aus gleichen Teilen m/10 Chlorkalium-, m/10 Chlornatrium- und m/10 Chlorcalciumlösung, um damit Stärke zu verzuckern. Blieb das Reaktionsgemisch 22 Stunden bei 37° stehen, so zeigte die Jodprobe je nach der zugefügten Salzmenge teilweisen oder vollständigen Abbau der Stärke. Daß in dem mit Jod ge-

¹⁾ *W. Biedermann*, „Fermentforschung“ III, S. 70, 1919; Münchener med. Wochenschrift 1922; Nr. 39, S. 1402—1404; diese Zeitschr. **129**, 582, 1922.

²⁾ Privatmitteilung des Herrn Geheimrat *Biedermann*. Eine Abhandlung ist z. Z. im Druck.

³⁾ *C. Neuberg*, diese Zeitschr. **71**, 135, 1915.

prüften gelben Reaktionsgemisch auch Zucker entstanden war, bewies der positive Ausfall der *Fehling* sehen Probe.

Es war von vornherein klar, daß ein wichtiger Faktor der jeweilige Zustand des Stärkemoleküls sein müsse. Ich hatte eine lösliche Stärke von *Kahlbaum*, mit A bezeichnet, zur Verfügung, dann ein ebensolches Präparat, vor Jahren selbst mit Salzsäure hergestellt und mit C bezeichnet, und eine gewöhnliche Kartoffelstärke. Zum Ansatz kamen immer $\frac{1}{2}$ ccm einer einprozentigen Lösung, die nach Zusatz von 0,1 bzw. 0,2, 0,3 (usw.) ccm Neutralsalzmischung auf 10 ccm im Reagenzrohr mit Wasser aufgefüllt wurde. Die Versuchsanordnung geht aus Tabelle I hervor. Wir sehen zunächst in Gläschen A von Versuch 1 die Kontrolle, die eine Mischung von 0,5 ccm Stärkelösung C (1 %) mit 9,5 ccm Wasser vorstellt. Nach 22 stündiger Einwirkung im Brutschrank bei 37° erfolgte auf Zusatz von einem Tropfen n/10 Jodlösung Blaufärbung. In Gläschen 1—5 war die Stärke vollständig abgebaut worden, und zwar durch Zusatz der Neutralsalzmischung Chlornatrium, Chlorkalium und Chlorcalcium. Wir sehen aus Versuch 1, daß schon 0,1 ccm Salzmischung zum vollständigen Abbau ausreichte. Wurde mehr Salzlösung verwendet, z. B. 0,7 ccm, so erfolgte die Hydrolyse nur bis zum Dextrin. Eine Steigerung bis 0,9 bzw. 1,0 ccm störte die Reaktion. Wir schließen hieraus, daß es auf das richtige Verhältnis von Salz zur Stärkelösung ankommt. Diese Beobachtung wurde sehr oft, auch bei den anderen Mischungen gemacht, und man gewinnt den Eindruck, daß die kleinsten Salz mengen oft am wirksamsten waren. Ein zweiter Versuch auf Tabelle I zeigt ein ähnliches Resultat, auch die Versuche auf Tabelle II. Die etwa 90 Versuchsreihen, mit verschiedenen Stärkesorten angesetzt, führten zu folgendem Resultat: Nur Stärke C ist für den Abbau durch Neutralsalze besonders geeignet. Von 20 Experimenten glückten allerdings nur die Hälfte. Die negativ verlaufenen Versuche hatten wahrscheinlich die Stärke C nicht in der richtigen Dispersion. Stärke A ist für diesen Abbau ungeeignet. Von 60 Versuchsreihen waren nur acht positiv ausgefallen, und zwar die meisten recht schlecht. Die Kartoffelstärke lieferte in allen fünf Fällen überhaupt keinen Abbau.

Für den negativen Ausfall der Versuche konnten zunächst zwei Gesichtspunkte ausschlaggebend sein. Einmal war nicht immer mit dem gleichen Kolloidzustande der Stärkelösung zu rechnen und vielleicht, damit im Zusammenhang stehend, wäre eine verschiedene Hydratation der Salzionen (s. weiter unten) möglich gewesen. Da nun die Experimente mit den natürlich vorkommenden Amylasen erwiesen hatten, daß eine äußerst peinlich genaue Vorbereitung der Stärkelösung nicht notwendig ist, so hoffte ich in meinem Falle die

Tabelle I.

Abbau einer Stärkelösung durch ein Gemisch von Neutralsalzen.

Die abgewogene, in wenig Wasser aufgeschlämmte lösliche Stärke C wurde in siedendes Wasser eingetragen und dann so weit aufgefüllt, damit eine 1proz. Lösung entstand. Zur Verwendung kamen ferner m/10 Lösung von KCl, NaCl und CaCl₂. Ein Gemisch dieser drei Salzlösungen wird mit Salzgemisch I bezeichnet. Alle Lösungen frisch bereitet. Wirkungszeit 22 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung C 1% .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I . . .	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau	hellgelb				gelb bräunlich		rotbraun		violett	
Versuch 2.											
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I . . .	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau			dunkel weinrot		gelb	hellgelb		rotbraun		

Tabelle II.

Abbau einer Stärkelösung durch ein Gemisch von Neutralsalzen.

Versuchsbedingungen wie Tabelle I. 20 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau			violett		rotviolett			braunrot		
Versuch 2.											
Stärkelösung A 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzgemisch I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färb. auf Zusatz von 2 Tr. n/10 Jodlösung	blau			rotviolett			violett				

Salze durch einen geeigneten Zusatz gefügsam für meine Reaktion zu machen. Bekanntlich geben Aminosäuren mit Neutralsalzen nach P. Pfeiffer¹⁾ Doppelverbindungen, und weil auf diese Art einmal eine Vergrößerung des Salzmoleküls zustande kommt, dann aber auch

¹⁾ P. Pfeiffer u. J. v. Modelski, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 329, 1912; 85, 1, 1913; P. Pfeiffer u. Fr. Wütka, Ber. 48, 1041, 1289, 1915; P. Pfeiffer, J. Würgler u. Fr. Wütka, Ber. 48, 1938, 1915.

auf diese Weise das Salz in den Kolloidzustand übergeführt wird — wässrige Aminosäurelösungen zeigen ja das Tyndallphänomen —, so war eine Möglichkeit gegeben, durch Zusatz dieser Ampholyte vielleicht zum Ziele zu kommen. Ich ließ also auf meine Stärkelösung das Gemisch von Neutralsalzen und gleichzeitig ein Gemisch von Aminosäuren (m/10 Alanin und m/10 l-Leucin) einwirken und beobachtete in der Tat einen intensiveren Stärkeabbau. Es wurde konstatiert, daß nicht nur die lösliche Stärke C, sondern auch die lösliche Stärke A und sogar die gewöhnliche Kartoffelstärke von dem Salz-Aminosäuregemisch hydrolysiert werden konnten. Bemerkt sei ausdrücklich, daß, um den Effekt hier recht deutlich zu zeigen, in den hier zu besprechenden Experimenten nur solche Versuchsreihen aus dem großen Versuchsmaterial ausgewählt wurden, bei denen die Neutralsalzmischung allein versagt hatte. Von 20 Experimenten verliefen zehn im gewünschten Sinne; fünf Versuchsreihen, die mit anderen Aminosäuregemischen, als oben angegeben wurde, angestellt waren, verliefen negativ, und von den letzten fünf Versuchsreihen ist die Ursache des negativen Ausfalles ihres Resultates noch nicht sicher erwiesen. Als günstiges Aminosäuregemisch hatte sich bis jetzt ein

Tabelle III.

Abbau der Stärke durch gleichzeitige Wirkung von Neutralsalzen und Aminosäuren.

Stärkelösung und Salzlösung wie auf Tabelle I bereitet. Aminosäuregemisch m/10 Alanin und m/10 Leucin. Wirkungszeit 20 Stunden bei 37°.

Mischung I: Gleiche Anzahl von ccm m/10 KCl, m/10 NaCl, m/10 CaCl₂.
 II: " " " " " m/10 Alanin, m/10 Leucin.
 III: " " " " " von Mischung I und II.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	
Versuch 1.												
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Mischung I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5	
Färbung auf J-Zusatz	blau											
Versuch 2.												
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Mischung II	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5	
Färbung auf J-Zusatz	blau											
Versuch 3.												
Stärkelösung C 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Mischung III	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5	
Färbung auf J-Zusatz	blau			blauviolett				braunrot				

gleiches m/10-Gemenge von Alanin und l-Leucin ergeben. Auf Tabelle III finden wir die näheren Versuchsbedingungen. Versuch 1 zeigt in diesem Falle die Unwirksamkeit des Gemisches von Chlorkalium, Chlornatrium und Chlorcalcium auf Stärke C. Ebenso hat das Aminosäuregemisch Alanin-Leucin, keine hydrolysierende Wirkung. (Versuch 2.) Treten hingegen beide Agenzien gleichzeitig in Reaktion, so erfolgt Abbau der Stärke, jedoch nur bis zum Erythrodextrin. (Versuch 3.) Ähnlich liegen die Verhältnisse auf Tabelle IV. Wir

Tabelle IV.

Abbau der Stärke durch gleichzeitige Wirkung von Neutralsalzen und Aminosäuren.

Wirkungszeit 43 Stunden bei 45 bis 50°, sonst alles wie auf Tabelle III.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung A 1 % .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 2.											
Stärkelösung A 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung II	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 3.											
Stärkelösung A 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Mischung II	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Wasser	9,5	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,0
Färbung auf J-Zusatz	blau	hellgelb	blau	hellgelb			blau	hellgelb	blau	hellgelb	hellgelb
Versuch 4.											
Stärkelösung A 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mischung I	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Mischung II	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,3	9,1	8,9	8,7	8,5	8,3	8,1	7,9	7,7	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau	hellgelb	rot	hellgelb		blau	hellgelb				

kommen hier mit dem Salz-Aminosäuregemisch bis zum Endziel, wenn wir die Reaktion 43 Stunden lang bei 45 bis 50° gehen lassen. Versuch 4 zeigt totalen Abbau der Stärke A. Merkwürdig ist, daß zwei in derselben Reihe liegende Gläschen desselben Versuches noch keine vollkommene Hydrolyse gaben. Dies ist in Versuch 3, der keine steigenden, sondern nur gleiche Mengen von Aminosäuren erhalten hat, noch auffälliger. Hier beobachten wir fast in der ganzen Reihe alternierend blau und gelb. Diese Versuche könnten auf die Not-

wendigkeit eines günstigen Verhältnisses von Neutralsalz zu Aminosäure hindeuten. Wiederholungen gaben ein ähnliches Resultat. Vollständiger Abbau bis zur Gelbfärbung trat jedoch bei den anderen Versuchsreihen in den wenigsten Fällen ein, aber immer ließ sich der steigende Einfluß des Aminosäuregemisches konstatieren.

Fast zur gleichen Zeit wie ich hatte *W. Biedermann* mit Hilfe von Chlornatrium und Glykokoll Stärke hydrolysiert, jedoch hatte er damals noch den Effekt in der Hauptsache der Aminosäure zugeschrieben. Daß Salze allein den Prozeß bewerkstelligen können, war zu jener Zeit von ihm noch nicht erkannt worden¹⁾.

Es war interessant zu erfahren, ob andere Aminosäuregemische eine ebensolche Wirkung wie die von uns benutzten auslösen. Mit den folgenden zwei Kombinationen Glykokoll + Tyrosin, Leucin + Isoleucin + Glykokoll + Alanin + Tyrosin konnten trotz Variation der Versuche keine Erfolge erzielt werden.

Diese noch wenig befriedigenden Resultate mit dem Neutralsalz-Aminosäuregemisch erwecken den Wunsch, noch andere Aktivatoren in das Bereich der Untersuchungen zu ziehen. Es war naheliegend, an niedere Polypeptide, Peptone und Albumosen zu denken. Einige Versuche, die mit Leucylglycin + Alanin + Leucin + dem genannten Neutralsalzgemisch angesetzt wurden, ergaben zum Teil positive, zum Teil negative Ergebnisse.

Besser fielen die Versuche mit einer Albumose (Aschegehalt = 5,6 %) der Firma *R. Schering* aus. Es liegen sieben Versuchsreihen mit verschiedenen Stärkesorten vor, die alle ein positives Resultat ergaben. Es sei von vornherein bemerkt, daß nicht alle Versuche gleichmäßig ausfielen und daß wieder nicht alle den totalen Abbau bis zur Maltose bzw. Glukose bewerkstelligten. Hervorzuheben ist ferner, daß sowohl die lösliche Stärke A als auch die gewöhnliche Kartoffelstärke, wenn letztere auch nur in 0,5 proz. Konzentration angewandt wurde, für das Experiment geeignet waren. Tabelle V zeigt die Anordnung, wie die Versuchsreihen mit ihren Kontrollen stets ausgeführt wurden. Zur Wiedergabe kam ein Versuch, der besonders den Einfluß der Albumose zeigen sollte. Bei den anderen Experimenten dieser Anordnung war manchmal schon Abbau durch Neutralsalze allein, manchmal durch Kombination zweier Komponenten des Reagenzgemisches eingetreten. Als Substrat der Versuche von Tabelle V diente Kartoffelstärke, die kleisterartig aufgequollen wurde. Der Versuch 1 zeigt, daß Neutralsalze allein keinen Abbau bewerkstelligen konnten, ebenso Aminosäuren allein (2), end-

¹⁾ *W. Biedermann*, Extrait des Archives Néerlandaises de Physiologie de l'Homme et des Animaux, tome VII, p. 151, 1922.

Tabelle V.

Abbau der Stärke durch das System: Neutralsalz + Aminosäuren + Albumose.
 Salzlösung: Gleiche Anzahl von ccm m/10 KCl, m/10 NaCl, m/10 CaCl₂.
 Aminosäuregemisch: Gleiche Anzahl von ccm m/10 Alanin, m/10 l-Leucin.
 Albumose (Schering) in 1 proz. Lösung. $\frac{1}{3}$ proz. KartoffelstärkeLösung.
 Wirkungszeit: 22 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 2.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 3.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 4.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,3	9,1	8,9	8,7	8,5	8,3	8,1	7,9	7,7	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau	violett									
Versuch 5.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,0	7,9	7,8	7,7	7,6	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 6.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,4	8,3	8,2	8,1	8,0	7,9	7,8	7,7	7,6	7,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 7.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Albumoselösung	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,3	8,1	7,9	7,7	7,5	7,3	7,1	6,9	6,7	6,5
Färbung auf J-Zusatz	blau	gelb	jodbraun		violett		gelb	violett			

lich Albumosen allein (3). Kamen die Aminosäuren mit der Salzlösung gleichzeitig in Reaktion, so erfolgte eine geringe Hydrolyse: die Stärkelösung färbte sich mit Jod violett (4). Jedoch die Mischung von den Salzen mit Albumosen (5) oder das Aminosäure-Albumosengemisch (6) verhielten sich passiv. Kamen dagegen alle Komponenten gleichzeitig zur Entfaltung, so war totaler Abbau in verschiedenen Reagenzgläsern eingetreten (7).

Mein Bestreben zielte dahin, eine ganz energische Stärkehydrolyse mit dem Salzgemisch zu erreichen. Außerdem war ein nie versagendes Reagenzgemisch sehr erwünscht. Als „Aktivator“ für das Aminosäure-Neutralsalzgemenge kam zunächst das leicht zugängliche Pepton „Witte“ (von *Kahlbaum* bezogen) in Frage. Von etwa 20 ähnlich angesetzten Stärkeabbauversuchen fielen fast alle Versuche positiv aus. Leider wurde auch hier nicht bei allen Experimenten die Zuckerstufe erreicht; oft waren noch einige Reagenzgläser rot bis rosa gefärbt. In manchen Reihen fehlte überhaupt die letzte Stufe. Aber immer wurde beobachtet, daß die stärkste Hydrolysewirkung von dem Hauptgemisch ausging, wenn auch manchmal die Salze allein oder das Salz-Aminosäuregemisch teilweisen Abbau verrieten. Das Hauptgemisch erwies sich so kräftig, daß alle Stärkesorten, sogar Kartoffelstärke, zum Kleister aufgequollen, angegriffen wurden. Am besten eignete sich jedoch die Stärke A in 1 Proz., und die Kartoffelstärke in $\frac{1}{2}$ Proz. Lösung. Es sei hier gleich der Einwand vorweggenommen, daß nicht etwa der Erfolg bei der Kartoffelstärke der eventuell noch anhaftenden Diastase zuzuschreiben ist. Ein Blick auf die zahlreichen Kontrollreihen der Tabelle VII lehrt, daß in dieser Anordnung sehr viele Einzelversuche hätten Abbau zeigen müssen, da sich das eventuell vorhandene Zymogen sehr oft mit „Aktivatoren“ (Salze, Aminosäuren) in Mischung befand. Im übrigen war auch die Stärkelösung gründlich gekocht worden. Die Mehrzahl der Versuche verlief bei 37°, jedoch auch Temperaturen von 45 bis 50° führten zum Ziel. Es kam auch zweimal vor, daß in den Versuchsreihen schon das Pepton allein stark abbaute, sogar besser als das Hauptgemisch. Das ist andererseits bei dem Aschegehalt des Peptons (1,4 %) nicht gerade verwunderlich, wenn man noch dazu annimmt, daß sich die Stärke auch mal in einem recht geeigneten Kolloidzustande befinden konnte. Man sieht hieraus jedenfalls, wie kompliziert die Sache liegt. In manchen Fällen reichte scheinbar der eigene Salzgehalt nicht aus und es wurde die Wirkung erst auf Salzzusatz erkenntlich.

Auf Tabelle VI finden wir in Versuch 1 wieder die Passivität des Neutralsalzgemisches (K Cl, Na Cl, Ca Cl₂) in 1 Proz. Stärkelösung. In der gleichen Weise verhält sich das Aminosäuregemisch Alanin + Leucin (Versuch 2). Pepton, in 1 Proz. Lösung der Stärke zu-

Tabelle VI.

Abbau der Stärke durch das System: Neutralsalz + Aminosäuren + Pepton.

Salzlösung und Aminosäuregemisch wie auf Tabelle V. Pepton (Kahlbaum) in 1proz. Lösung, durch Schütteln gelöst, dann filtriert. Stärke A; Wirkungszeit: 20 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5

Färbung auf J-Zusatz

blau

Versuch 2. Prüfung des Aminosäuregemisches. Zahlenmäßiger Ansatz und Resultat wie 1.

Versuch 3. Prüfung der Peptonlösung. Jedes Gläschen erhält 1 ccm 1proz. Peptonlösung. Sonst Ansatz und Resultat wie 1.

Versuch 4. Prüfung des Salz-Aminosäuregemisches. Ansatz wie 1; Resultat: Kontrolle blau, die anderen Gläser violett.

Versuch 5.

Stärkelösung	}	Zahlen wie in 1									
Salzlösung											
Peptonlösung 1 %											
Wasser			Auf 10 ccm aufgefüllt								
Färbung auf J-Zusatz	blau	violett	rot	dunkelrot	braun						

Versuch 6.

Stärkelösung	}	Zahlen wie oben									
Aminosäurelösung											
Peptonlösung 1 %											
Wasser											
Färbung auf J-Zusatz	blau	dunkelviolet									

Versuch 7.

Stärkelösung	}	Zahlen wie oben									
Salzmischung											
Aminosäurelösung											
Pepton 1 %			Jedes Gläschen 1 ccm								
Wasser			Auf 10 ccm aufgefüllt								
Färbung auf J-Zusatz	blau	violett	rosa	gelb	rosa	rot	hellviolett	gelb	gelbrot		

gegeben, vermag auch keine Hydrolyse zu veranlassen (3), dagegen wohl, wenn es durch Neutralsalze unterstützt wird (5). Wir beobachten auf Jodzusatz mehrere rotgefärbte Gläser, zwei sogar braungefärbt. Das Salz-Aminosäuregemisch war in dieser Versuchsreihe von geringer Wirkung, alle Gläser färbten sich mehr oder weniger violett (4). Das Hauptgemisch (Salze + Aminosäuren + Pepton) hingegen erzielte kräftige Hydrolyse (7). Die meisten Gläser sind rot bis rosa, drei davon gelbgefärbt: also totaler Abbau. Tabelle VII bringt das Resultat noch deutlicher. Der Versuch war mit Kartoffel-

Tabelle VII.

Abbau der Kartoffelstärke durch das System: Neutralsalz + Aminosäuren + Pepton.

Salzlösung und Aminosäuregemisch wie auf Tabelle V. Pepton (Kahlbaum) in 1proz. Lösung; durch Schütteln gelöst, dann filtriert. Kartoffelstärke; Wirkungszeit 20 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	cc.n	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung $\frac{1}{2}$ % .	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										

Versuch 2. Prüfung des Aminosäuregemisches. Ansatz und Resultat wie Tabelle VI.

Versuch 3. Prüfung der Peptonlösung. Ansatz und Resultat wie Tabelle VI.

Versuch 4. Prüfung des Salz-Aminosäuregemisches. Ansatz und Resultat wie Tabelle VI.

Versuch 5. Prüfung des Salz-Peptongemisches. Ansatz wie Tabelle VI. Resultat: Kontrolle blau, die andern Gläser braun.

Versuch 6. Prüfung des Aminosäure-Peptongemisches. Ansatz wie Tabelle VI. Resultat: Alle Gläser blau.

Versuch 7. Prüfung des Salz-Aminosäure-Peptongemisches. Ansatz wie Tabelle VI. Resultat: Kontrolle blau, die andern Gläser gelb.

stärke ausgeführt worden. Die meisten Versuche zeigen keinen Stärkeabbau (1 bis 4; 6). Das Salz-Peptongemisch dagegen brachte in allen Gläsern auf Jodzusatz Braunfärbung (5). Am vollständigsten ist die Hydrolyse in Versuch 7, also mit dem Hauptgemisch: hier ist in allen Gläsern vollständige Zerlegung des Stärkemoleküls erfolgt.

Es trat jetzt die Frage auf, ob die einzelnen Salze, bzw. die einzelnen Aminosäuren schon diastatisch wirken, weshalb alle Komponenten einzeln durchgeprüft wurden. Es stellte sich heraus, daß die Salzindividuen, in Mischung mit Aminosäuren geprüft, zwar teilweise etwas hydrolysieren, daß aber das Gesamtgemisch wie immer am kräftigsten wirkte. Man gewinnt aus dem großen, vorliegenden Versuchsmaterial den Eindruck, daß es auf eine geeignete Mischung ankommt. Die einzelnen Komponenten mögen sich gegenseitig bei der Aufspaltung der Stärke unterstützen.

Tabelle VIII bringt zunächst in den Versuchen 1, 2 u. 4 die totale Passivität des Salzgemisches Chlornatrium + Chlorcalcium, für sich geprüft als auch im Verein mit Aminosäuren, ebenso im Verein mit Pepton. Dagegen ist wieder das Hauptgemisch stark aktiv (3).

In Tabelle IX wurden die Salze einzeln, jedoch im Beisein von Aminosäuren und Pepton geprüft. Versuch 1 läßt eine schwache Zer-

Tabelle VIII.

Abbau der Stärke durch das System: Neutralsalz + Aminosäuren + Pepton.

Salzlösung nur m/10 NaCl + m/10 CaCl₂. Aminosäuregemisch: m/10 Alanin, m/10 l-Leucin, Pepton (Witte) 1proz., Stärke A. Wirksamkeit: 20 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung 1 ₂ %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Salzlösung	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Wasser	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0	8,9	8,8	8,7	8,6	8,5
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 2.											
Stärkelösung 1 %	0,5	0,5	} Zahlen wie in 1.								
Salzlösung	—	0,1									
Aminosäuregemisch	—	0,1	} Zahlen wie bei der Salzlösung.								
Wasser	9,5	9,3									
Färbung auf J-Zusatz	blau										
Versuch 3.											
Stärkelösung	0,5	0,5	} Zahlen wie in 1.								
Salzlösung	—	0,1									
Aminosäuregemisch	—	0,1	} Zahlen wie in 2.								
Peptonlösung	—	1,0									
Wasser	9,5	8,3	} Jedes Gläschen 1 ccm Peptonlösung. Auf 10 ccm aufgefüllt.								
Färbung auf J-Zusatz	blau	violett		rot		braungelb			rot		
Versuch 4.											
Stärkelösung 1 %	0,5	0,5	} Zahlen wie in 1.								
Salzlösung	—	0,1									
Peptonlösung 1 %	—	1,0	} Jedes Gläschen 1 ccm Peptonlösung. Auf 10 ccm aufgefüllt.								
Wasser	9,5	9,3									
Färbung auf J-Zusatz	blau										

legung der Stärke durch Natriumchlorid erkennen, während Kaliumchlorid (2) und Calciumchlorid (3) unwirksamer sind. In Versuch 4 haben wir einen besonders guten Fall für die Intensität des Hauptgemisches. Da Pepton allein hier auch schon hydrolysiert (Versuch nicht aufgeführt), so müssen wir in Anbetracht der kräftigen Stärkerzerlegung in allen Experimenten annehmen, daß in der Versuchsreihe Tabelle IX eine besonders günstig präparierte Stärkelösung vorgelegen haben muß.

Alanin und Leucin, jedes für sich allein mit Salzen und Pepton auf hydrolytische Kraft geprüft, gaben zum Teil eine sehr schwache, zum Teil keine Reaktion.

Zum Schluß wurden auch in einigen Versuchen gleichzeitig Albumosen und Peptone im Verein mit Neutralsalz und Aminosäuren angewendet, doch war kein besonderer Erfolg zu beobachten. Man gewinnt öfters den Eindruck, daß ein Überschuß an Reagenz der Kombination der Hydrolysereagenzien schädlich ist.

Tabelle IX.

Abbau der Stärke durch das System: *Neutralsalz + Aminosäure + Pepton.*

Wirkung einzelner Salze im Gemisch mit den bisher verwendeten Aminosäuren und Pepton. Pepton (*Witte*) 1proz., Stärke A. Wirkungszeit: 20 Stunden bei 37°.

Reaktionsgemisch	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Versuch 1.											
Stärkelösung 1 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
m/10 NaCl	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Aminosäuregemisch	—	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Pepton 1 %	—	1,0	0,1	1,0	1,0	0,5	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	9,5	8,3	8,1	7,9	7,7	7,5	7,3	7,1	6,9	6,7	6,5
Färbung auf J-Zusatz	blau	braunrot						braun			
Versuch 2.											
Stärkelösung 1 %	}	Zahlen wie oben.									
m/10 KCl											
Aminosäuregemisch											
Pepton 1 %											
Wasser											
Färbung auf J-Zusatz	blau	dunkelrot			blau			dunkelrot			
Versuch 3.											
Stärkelösung 1 %	}	Zahlen wie oben.									
m/10 CaCl ₂											
Aminosäuregemisch											
Pepton 1 %											
Wasser											
Färbung auf J-Zusatz	blau	violett									
Versuch 4.											
Stärkelösung 1 %	}	Zahlen wie oben.									
Gemisch der 3 Salze											
Aminosäuregemisch											
Pepton 1 %											
Wasser											
Färbung auf J-Zusatz	blau	hell rotbraun				gelb					

B. Physiko-chemische Faktoren beim Abbau der Stärke.

Ein wichtiger Faktor, der in unserer Versuchsanordnung höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle spielt, ist der Dispersitätsgrad der Stärkelösung. Leider waren bisher alle Aufklärungsversuche in dieser Richtung gescheitert. Es wurden Stärkelösungen nach den verschiedensten Methoden bereitet, es wurde auch die Viskosität der Lösungen bestimmt, jedoch ohne merklichen Gewinn für die Reaktion. Diesen orientierenden Versuchen müssen sich systematische anschließen. Da das Alter der Stärkelösung auch eine Rolle spielen kann, so wurden stets frisch bereitete Lösungen verwendet.

Die natürlich vorkommenden Diastasen haben in bezug auf die Wasserstoffionenkonzentration ein verschiedenes Optimum. So wird

für die Malzdiastase ein p_H von 4,7, für Pankerasdiastase $p_H = 8,5$, und für Speicheldiastase 6,4 angegeben. Da H-Ionen allein schon Stärke zu hydrolysieren vermögen, so war unser Bemühen, möglichst um den Neutralpunkt die Reaktion vorzunehmen. Aus diesem Grunde wurde auch nicht mit primärem Kaliumphosphat operiert. Unser System Neutralsalz + Aminosäure + Pepton lieferte ein $p_H = 7,4$, so daß wir bei ganz schwach alkalischer Reaktion hydrolysieren konnten.

Neutralsalzmischung (wie in den Tabellen)	0,3 ¹⁾	0,5	0,9 cm
Aminosäuremischung " " " "	0,3	0,5	0,9 "
Peptonlösung 1 % (Witte)	1,0	1,0	1,0 "
Stärkelösung A 1 %	0,5	0,5	0,5 "
Wasser	7,9	7,5	6,7 "
p_H (elektrometr. gemessen) d. obig. Mischung:	7,40	7,40	7,40 cm

Wie hat man sich nun die Hydrolyse durch dieses Salz-Aminosäure-Peptongemisch vorzustellen? Es ist höchst wahrscheinlich, daß zunächst die Salzionen hydratisiert werden (*Kohlrausch*, *Riesenfeld*, *Nernst*). In der zweiten Phase entstehen Adsorptionsverbindungen der Stärke mit dem Chlornatrium z. B., wodurch das an die Ionen gebundene Wasser wieder frei wird, und zwar im aktiven Zustande mit OH- und H-Ionen, die jetzt die Stärke hydrolysieren. Die Ionen des Chlornatriums wären also teilweise mit H- bzw. mit OH-Ionen beladen gewesen.

Diese Hydratation des Neutralsalzes geht wahrscheinlich im Kolloidzustand besser als im molekulardispersen System vor sich, weshalb die Aminosäuren als Dispersoide den Prozeß unterstützen. Die besonders starke Hydratation mancher Kolloide ist ja eine allbekannte Erscheinung. Da nun Aminosäuren nach *P. Pfeiffer* Doppelverbindungen mit Neutralsalzen in wässriger Lösung bilden, so müssen auch diese einen kolloiden Zustand annehmen, wodurch eine stärkere Hydratation des Salzes bewerkstelligt wird. Ähnlich wird auch Pepton wirken. Die Stärkehydrolyse könnte nun noch unterstützt werden durch die eigene Hydratation der Aminosäuren und des Peptons.

Nun ist aber beobachtet worden, daß Neutralsalze allein schon Stärke abgebaut haben. In diesem Falle wird eine günstige disperse Phase der Stärke vorhanden gewesen sein, die durch die geringe Hydratation der Salze allein schon verzuckert werden konnte. Ob uns das Studium der Beziehung der Hydratation zur inneren Reibung (*H. Euler*) des Gemisches Neutralsalz + Aminosäure + Pepton zur weiteren Klärung unserer Aufgabe führen wird, das muß die Zukunft lehren.

¹⁾ Zur Erhöhung der Leitfähigkeit wurde etwa $\frac{1}{2}$ g KCl zugegeben. Die beiden anderen Versuche wurden ohne Zusatz gemessen.

Was nun die Frage nach dem Zuckerabbau durch eine eingetretene Infektion anbetrifft, so ist ein Aufkommen von Mikroorganismen bei der gewählten Zusammensetzung des Reaktionsgemisches nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Seit aber der Streit um *Biedermanns* Versuche in dieser Angelegenheit verstummt ist, so wird man wohl auch hier den Zuckerabbau Mikroorganismen nicht zuschreiben. Eine grobe Infektion, die makroskopisch sichtbar wäre, ist ausgeschlossen. Im Mikroskop jedoch sieht man in den Peptongläsern einzelne Stäbchen und verkümmerte Hefen. Eine Reihe von Verzuckerungsversuchen gab auch bei höherer Temperatur wie 45 bis 50° oder 50 bis 52° positive Resultate. Es müßte denn hier ein ausgesprochen thermophiler, stark verzuckernder Bazillus sein Spiel treiben. Aber, muß man sich fragen, warum sollte denn Infektion immer nur in einigen Versuchen, nämlich denen des Zuckerabbaus, eintreten und nicht in solchen, die fast die gleiche Nährlösung (Tabelle V, 2, 5, 6; Tabelle VI, 2, 3, 6; Tabelle VII, 2, 3, 6) den Bakterien darbieten könnten! Und dies mit großer Regelmäßigkeit. Warum sind z. B. die Stärke-Aminosäuregemische nicht infiziert, und warum sollte dies gerade der Fall sein bei den Stärke-Salzgemischen, also bei Stickstoffmangel! (Tabelle I bis IV). Und ähnlichen Verlegenheiten würden wir bei den anderen Gemischen begegnen.

Absichtlich sind bisher bei den meisten Versuchen keine antiseptischen Mittel verwendet worden, um das klare Reaktionsbild nicht zu stören. Arbeitet man unter Thymoldeinfektion, so gelingt die Verzuckerung ebenfalls bei 32° als auch bei 45°. Die Kontrollproben bleiben blau. Diese Versuchsanordnung gab bisher so ausgezeichnete Resultate, daß fast an eine günstige Mitwirkung des Thymols gedacht werden könnte. Das Versuchsmaterial wird später veröffentlicht.

Bei Anwendung von durch Hitze sterilisierten Lösungen und Reagenzgläsern mit Watteverschluß ist nur in drei Gläsern Abbau bis zum Erythrodextrin erfolgt, in den übrigen Gläsern war die Stärke unverändert geblieben. Dieses schlechte Resultat ist nach *W. Biedermann*¹⁾ dem Luftmangel zuzuschreiben. Wurde derselbe Versuch (steril) mit offenen Gläsern wiederholt, so trat bei 45° in 22 Stunden in allen Gläsern totale Hydrolyse ein.

Zum Schlusse wurde noch die oben erwähnte aufgefundene Infektion (Stäbchen und verkümmerte Hefen) in Bierwürzelösung angereichert, auf Verzuckerungsfähigkeit geprüft. Zwei Verzuckerungsreihen kamen wie in Tabelle VI, 7 zum Ansatz: eine Reihe normal, von der andern bekam jedes Gläschen fünf Tropfen von der mit der

¹⁾ *W. Biedermann*, diese Zeitschr. 129, 582, 1922.

Infektion stark angereicherten Würze. Wurde nun nach 22 Stunden Wirkungszeit mit Jod geprüft, so zeigten die nicht künstlich infizierten Gläser die normale Verzuckerung, während die infizierten Gläser noch die normale Stärkebläuung aufwiesen. Also: die Experimente mit den Mikroorganismen ergaben keine Stärkehydrolyse. Die Infektion ist nicht in der Lage, die Verzuckerung vorzunehmen bzw. in diesem Falle zu beschleunigen. Die Infektion hatte sogar das Gegenteil bewirkt, die Hydrolyse verhindert, offenbar dadurch, daß die Mikroorganismen die Aminosäuren und das Pepton aufgezehrt hatten.

Sämtliche Experimente dieses Abschnittes sprechen für eine rein chemische Hydrolyse der Stärke ohne Mitwirkung von Lebewesen.

In welcher Beziehung all die Ergebnisse dieser Arbeit zur natürlichen Amylase stehen, das muß sich noch erweisen. Jedenfalls ist das System Neutralsalz + Aminosäure + Pepton (Albuminose) in der lebenden Zelle heimisch, weshalb auf eine Verwandtschaft mit der Amylase geschlossen werden könnte. Sicher wird ein solches System bei dem Verzuckerungsprozeß in der Zelle aktiv beteiligt sein. Aber unser katalytischer Effekt ist vor der Hand noch zu gering, um einen ernsten Vergleich mit dem Enzym aufzunehmen. Höchstens die schwache Kartoffelamylase könnte in ihrer Wirkung unserem künstlichen Hydrolysereagenz etwas näher kommen. Ausgeschlossen ist es jedoch nicht, daß wir hier das Amylasemodell in seiner einfachsten Form vor uns haben.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Fräulein A. Nickel für ihre gute Unterstützung bestens zu danken. Auch bin ich Herrn cand. chem. H. Schweigart, der vorübergehend an der Arbeit teilnahm, zu Dank verpflichtet.

Wirkt Vitaminmangel spezifisch oxydationshemmend?

Von

Kiyoshi Morinaka (Mukden).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. Dezember 1922.)

Aus den bisher vorliegenden Versuchen am Hunde [*Tsuji* (1)] und an Tauben [*Abderhalden* (2)] ergibt sich, daß bei vitaminfreier Ernährung neben der Abnahme des Körpergewichts auch eine Abnahme der Oxydation vor sich geht, d. h. der Sauerstoffverbrauch, pro Minute auf das Kilo Körpergewicht berechnet, wird geringer. Diese Abnahme des Sauerstoffverbrauchs beruht auf einer Abnahme der Zellatmung. Denn *Abderhalden* und *Wertheimer* (3) wie *Hess* (4) haben gefunden, daß Organbrei avitaminöser Tauben eine herabgesetzte Oxydation erkennen läßt, und auf der anderen Seite hat *György* (5) festgestellt, daß Zusatz von Vitaminlösungen zu Organbreimassen normaler Tiere eine Steigerung der Oxydation bedingt. Dazu ist zu bemerken, daß nach den Angaben von *F. Gröbbels* (6) bei diesen Oxydationsversuchen an Mäusen eine kurze initiale Periode einer Oxydationssteigerung zu beobachten ist.

Wir haben es nun bei der Herabsetzung der Oxydation mit einer Erscheinung zu tun, die auch für den Hungerzustand charakteristisch ist. Während aber beim Hungerzustande die Deutung dieses Phänomens keine Schwierigkeit bereitet, da die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs hier parallel mit der Abnahme des Körpergewichts geht, war es bei der Avitaminose zunächst fraglich, ob hier das gleiche anzunehmen wäre, bis dann die erwähnten Versuche über die Zellatmung eine Klärung brachten. Beim Hunger liegt die Sache nämlich einfach so, daß hier nur deshalb mit der Zeit weniger oxydiert wird, weil immer weniger Körpermaterial vorhanden ist. Es ist hier die Abnahme der Oxydation die Folge der Protoplasmaeiweißschmelzung. Bei der Avitaminose liegen die Verhältnisse komplizierter. Gewiß muß auch hier als Folge des Protoplasmaschwundes die Oxydationsgröße

abnehmen. Aber es ist auch durch den Vitaminmangel an sich die Oxydation herabgesetzt, und dann muß bei der tatsächlichen großen Körpergewichtsabnahme Körpermaterial ohne den normal-physiologischen Sauerstoffverbrauch in gesteigertem Maße zersetzt werden. Natürlich braucht eine solche, durch den Vitaminmangel direkt erzeugte Oxydationsverminderung nicht in dem Umfange vorhanden zu sein, daß sie bei periodisch vorgenommenen Gaswechselversuchen zur Anschauung kommt. Es kann die überschlägliche Rechnung auch hier immer nur eine ungefähr dem Körpergewichtsverlust entsprechende Oxydationsveränderung erkennen lassen. Aus diesem Grunde schien es mir angezeigt, einmal zu prüfen, wie sich das Oxydationsvermögen des avitaminösen Körpers, gemessen an ganz bestimmten Aufgaben, verhält.

Es gibt im Körper Prozesse, bei denen die Oxydation leicht, und andere, bei denen sie schwer vonstatten geht. So läßt sich auch die Oxydationsenergie des Körpers prüfen, wenn man ihm das eine Mal leicht, das andere Mal schwer oxydierbare Substanzen zuführt, oder wenn man im Stoffwechsel des avitaminösen Körpers Anhaltspunkte findet, die auf eine mangelhafte Oxydation hindeuten.

Ich habe an zwei Hunden folgende Versuche gemacht:

Erster Versuch.

Ein Hund von 4800 g Körpergewicht erhält 34 Tage lang vitaminhaltige Stoffwechselkost von bestimmtem Kalorien- und bestimmtem N-Gehalt. Das Körpergewicht bleibt auf konstanter Höhe. In den 24stündigen Harnmengen wird täglich der Gehalt an flüchtigen Fettsäuren ermittelt. Am 31. und 32. Versuchstage erhält das Tier je 3 g Natriumacetat per os. Der Gehalt des Harns an flüchtigen Fettsäuren zeigt nach der Natriumacetatgabe keine nennenswerte Veränderung (s. Tabelle I). Nunmehr wird das Tier mit derselben, aber vitaminfreien Stoffwechselkost gefüttert. Das Körpergewicht nimmt sofort ab. Vom 43. bis 47. Versuchstage werden wieder in den 24stündigen Harnmengen die flüchtigen Fettsäuren bestimmt. Am 46. und 47. Versuchstage erhält das Tier abermals je 3 g Natriumacetat per os. Der Harn hatte in der ganzen Zeit der vitaminfreien Ernährung zwar einen unbedeutend herabgesetzten Gehalt an flüchtigen Fettsäuren im Vergleich zu der Periode mit vitaminhaltiger Nahrung, aber die Gabe des Natriumacetats übte keinen Einfluß aus (s. Tabelle II).

Schon am Tage nach der letzten Acetatgabe erkrankte der Hund schwer an avitaminösen Erscheinungen (Korneatrübung, schwankender Gang, Lähmungen usw.), es stellten sich leichte Durchfälle ein, und er starb am 50. Versuchstage. Daß der Tod so rasch erfolgte, hat seinen Grund darin, daß der Körper durch eine diesem ganzen hier geschilderten Versuche vorangehende 75tägige Periode mit vitaminfreier Nahrung völlig an Vitamin verarmt war; in dieser Periode hatte das Tier schon stark an Körpergewicht abgenommen. Der Hund hatte schwere nervöse Erscheinungen und Korneatrübung gezeigt, Symptome, die aber alle rapid zurückgingen, als das Tier die Vitaminzulage zu seinem Stoffwechselfutter erhielt.

Tabelle I.

Die normale Nahrung bestand aus:	Das Salzgemisch bestand aus:
Pferdefleischpulver ¹⁾ . . . 35 g	Kochsalz 250 g
Poliertem Reis 5 g	Calciumphosphat. . 100 g
Reiskleie 8,4 g	Magnesiumcitrat . . 100 g
Zucker 6,7 g	Kaliumchlorat . . . 15 g
Citronensaft 30 ccm	Ferrum Citricum . . 30 g
Butter 35 g	Kalium jodatum. . . 0,1 g
Salzgemisch 2 g	Jod 0,05 g
Wasser 800 ccm.	

Versuchs- tage	Körper- gewicht g	Harnmenge ccm	Flüchtige Fettsäuren in 24 Stunden als n/10 Säure ccm	Natriumacetat g
25	4810	700	21,7	
26	4850	420	18,5	
27	4800	850	23,8	
28	4850	620	19,2	
29	4850	630	17,6	
30	4800	630	21,7	3,0 per os
31	4820	650	18,9	3,0 per os
32	4830	800	20,8	
33	4810	850	22,9	

Tabelle II.

Die vitaminfreie Nahrung bestand aus:

Pferdefleischpulver	35 g
Poliertem Reis	25 „
Schweineschmalz.	35 „
Salzgemisch (wie oben)	2 „
Wasser	700 „

Versuchs- tage	Körper- gewicht g	Harn- menge ccm	Flüchtige Fettsäure in 24 Stdn. ccm	Na-Acetat g	Gesamt-N	Gesamt-S	Neutral-S
					(als Ba SO ₄)		
43	4700	490	17,6		4,5276	2,1315	0,9094
44	4720	530	11,7		3,9029	3,6888	1,1580
45	4740	440	18,9		3,7699	2,2704	1,2012
46	4800	530	21,2	3 per os	3,2648	1,9292	0,9275
47	4650	380	11,0	3 per os	2,7710	1,8772	0,8759
48	4510				2,1482	1,4560	0,5286
49	4340						
50	4050	Tod					

Das Ergebnis dieses Versuchs läßt sich dahin zusammenfassen, daß Vitaminmangel den Gehalt des Harns an flüchtigen Fettsäuren

¹⁾ Das Pferdefleischpulver war durch mehrtägiges Kochen in Wasser unter wiederholter Erneuerung des Waschwassers vitaminfrei gemacht worden.

nicht ändert, und daß auch dadurch die Oxydation des Natriumacetats im Körper keine Störung erfährt.

Zweiter Versuch.

Ein bisher bei völlig normaler Nahrung gehaltener Hund wird bis zu seinem an einer interkurrenten Krankheit (Pneumonie) erfolgten Tod 65 Tage vitaminfrei ernährt. Der Gehalt der 24stündigen Harnmenge an flüchtigen Fettsäuren wird vom 15. bis 31. und vom 49. bis 63. Versuchstage bestimmt. An verschiedenen, aus der Tabelle IV ersichtlichen Tagen erhält das Tier 4 bis 8 g Natriumacetat per os oder in drei Fällen 4 g Natriumacetat subkutan eingespritzt. In den beiden Perioden — in der ersten, als eben der Körper anfang, an Vitaminvorrat zu verarmen, und in der zweiten, als der Körper bereits beträchtlich Vitamin verloren hatte — war der Gehalt des Harns an flüchtigen Fettsäuren ungefähr der gleiche, und es ließ sich auch kein irgendwie ins Gewicht fallender Unterschied in dieser Hinsicht feststellen, weder in den beiden Perioden ohne, noch in den Perioden mit Zufuhr entsprechender Mengen von Natriumacetat. Gewiß war der flüchtige Fettsäuregehalt des Harns etwas erhöht nach der Gabe exorbitant hoher Dosen des Acetats per os oder nach dessen subkutaner Zufuhr, aber es trat in dieser Hinsicht keine Änderung mit der fortschreitenden Avitaminose ein.

Bei diesem Hunde des zweiten Versuchs habe ich nun in der Zeit vom 34. bis 43. Versuchstage und dann später noch einmal vom 63. bis 68. Versuchstage im Harn die Gesamtstickstoffausscheidung und den Gehalt an Gesamtschwefel und Neutralschwefel ermittelt. In beiden Perioden verlief die Gesamtstickstoffausscheidung parallel der Gesamtschwefelausscheidung, in beiden Perioden war aber das Verhältnis des Gesamtschwefels zum Neutralschwefel ein derartiges, daß der Neutralschwefel etwa ein Drittel bis die Hälfte des Gesamtschwefels ausmachte (s. Tabelle V). Das sind Zahlen, die nach *Kunkel* (7) und *Heffter* (8) der Norm entsprechen; der saure Schwefel kann beim Hunde 53 % oder etwas mehr des Gesamtschwefels ausmachen.

Diese Beobachtung über die Schwefelausscheidung bei der Avitaminose steht insofern in Beziehung zu meinen Versuche über den Gehalt des Harns an flüchtigen Fettsäuren, als eine Störung in der Schwefelverteilung immer der Ausdruck einer Störung im intermediären Eiweißstoffwechsel ist, d. h. sie zeigt an, ob der Eiweißstoffwechsel in seinem Ablauf qualitativ verändert ist. Nur wenn die Ausscheidung des Neutralschwefels relativ vermehrt ist, der ja den mangelhaft oxydierten Teil des Schwefels darstellt, könnte mit Wahrscheinlichkeit in einem Falle wie dem vorliegenden (avitaminösen), von einer Herabsetzung der Oxydation die Rede sein.

Nun zeigen aber meine Schwefelanalysen, daß die Oxydation der schwefelhaltigen Komplexe des Eiweißmoleküls in normalen Bahnen verlief. Daraus geht jedenfalls das eine mit Sicherheit hervor, daß bei der Avitaminose die Zersetzung des Eiweißes qualitativ nicht gestört ist, soweit es sich um die Schwefelkomplexe des Eiweißmoleküls handelt.

Tabelle III.

Die Nahrung bestand aus:

Pferdefleisch	40 g
Poliertem Reis	50 „
Margarine	20 „
Salzgemisch	3 „
Wasser	750 „

Versuchs- tage	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Flüchtige Fett- säuren in 24 Std. als n/10 Säure ccm	Na-Acetat g
15	8050	490	10,05	4,0 per os
16	8050	560	20,16	
17	8100	690	12,76	
18	8120	860	17,36	
19	8120	640	19,84	8,0 per os
20	8090	560	15,40	
21	8090	620	27,28	
22	8080	750	18,00	
23	8000	660	32,34	4,0 subkutan
24	8070	850	19,87	
25	8080	460	17,02	
26	8000	630	21,42	
27	7950	550	21,45	4,0 subkutan
28	7970	600	8,40	
29	7980	630	15,12	
30	7960	750	36,00	
31	7900	590	14,75	

Tabelle IV.

Die Nahrung bestand aus:

Fleischpulver	40 g
Reis	50 „
Schweineschmalz	20 „
Salzgemisch	3 „
Wasser	750 „

Versuchs- tage	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Flüchtige Fett- säuren in 24 Std. als n/10 Säure ccm	Na-Acetat g
49	7306	580	19,14	8,0 per os
50	7306	460	17,91	
51	7250	510	16,32	
52	7250	580	12,76	
53	7200	650	29,90	8,0 per os
54	7100	610	47,58	
55	7050	750	33,75	
56	7030	550	20,35	
57	7000	580	19,86	4,0 subkutan
58	6930	570	21,09	
59	6930	560	20,72	
60	6950	580	12,76	
61	6950	600	28,20	
62	6920	520	24,96	
63	6720	650	24,05	

Tabelle V.

Versuchs- tage	Körpergewicht g	Harnmenge ccm	Gesamt-N pro Tag g	Gesamt-S als BaSO ₄ g	Neutral-S als BaSO ₄ g
34	7600	600	4,5738	1,8040	0,8443
35	7550	500	4,5738	1,8040	0,8443
36	7500	620	5,3122	1,9074	0,7263
37	7520	400	5,3122	1,9074	0,7263
38	7520	510	4,9893	2,0368	0,9944
39	7520	520	4,9893	2,0368	0,9944
40	7520	440	5,4018	2,0072	1,2358
41	7420	600	5,4018	2,0072	1,2358
42	7500	420	4,6939	1,8766	1,1515
43	7520	460	4,6939	1,8766	1,1515

Tabelle VI.

63	6720	650	5,2395	2,2500	0,7040
64	6650	620	6,9308	3,1868	1,3129
65	6500	675	5,7662	2,5178	0,8303
66	6500	620	6,1628	2,9760	0,9027
67	6450	620	6,6836	3,0473	1,0509
68	6300	690	7,1387	4,0710	1,6256

Schluß.

Aus allen im vorstehenden mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß bei der Avitaminose die Oxydation leicht oxydierbarer Substanzen, wie z. B. des Natriumacetats, nicht gestört ist, und daß die Oxydation des schwefelhaltigen Komplexes des Zelleiweißmoleküls in normalen Bahnen verläuft. Ob bei schwerer oxydierbaren Substanzen, als es das Natriumacetat und die schwefelhaltigen Eiweißkomplexe sind, sich im avitaminösen Zustande Oxydationshemmungen nachweisen lassen, muß dahingestellt bleiben. Wenn nun die Vitamine trotz des Ausfalls meiner Versuche in spezifischer Weise oxydationssteigernd wirken, so kommt der Ausfall dieser Wirkung der Vitamine bei den Vorgängen, die durch meine Versuche geprüft wurden, jedenfalls nicht zur Anschauung.

Alle Beobachtungen über die Oxydationsverminderung bei der Avitaminose können natürlich die logische Forderung niemals beiseite schieben, daß trotz der Oxydationsverminderung bei dem sinkenden Körpergewicht der Gesamtumsatz, also einschließlich der resorbierten Nahrung, gesteigert sein muß. Nur das Endprodukt des Umsatzes braucht eben nicht die CO₂ zu sein. Vielleicht wird C in vermehrter Menge durch den Harn ausgeschieden, vielleicht macht die Zersetzung bei Zwischenstufen Halt, die entweder im Körper zurückbleiben oder durch die Exkretionsorgane mit Ausnahme der Lungen ausgeschieden werden.

Bemerkungen.

Methodik: Die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren machte ich nach *E. Welde* (9) im Vakuum unter gleichzeitiger Wasserdampfdestillation. Den gesamten Schwefel bestimmte ich nach *Benedict* (10). Den Neutralschwefel bekam ich indirekt durch Subtraktion des Wertes der Gesamtschwefelsäure, die nach *Folin* (11) bestimmt wurde, von dem Gesamtschwefelwerte.

Literatur.

1) *Tsuji*, diese Zeitschr. 129, 194. — 2) *E. Abderhalden*, Pflügers Arch. f. ges. Physiol. d. Menschen u. Tiere 187, 87. — 3) *E. Abderhalden* und *Wertheimer*, ebendasselbst 194, 647. — 4) *W. R. Hess* und *N. Messerle*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 119, 176 bis 189, 1922. — 5) *György*, Jahrb. f. Kinderheilk. 94, 555 bis 563, 1921. — 6) *F. Groebbel*, Klin. Wochenschr. 1. Jahrg., Nr. 43, S. 2130, 1922. — 7) *A. Kunkel*, Pflügers Arch. f. ges. Physiol. d. Menschen u. Tiere 14, 344. — 8) *A. Heffter*, ebendasselbst 88, 504. — 9) *E. Welde*, diese Zeitschr. 28, 504. — 10) *S. R. Benedict*, Journ. of biol. chem. 6, 363. — 11) *O. Folin*, ebendasselbst 1, 131.

Neue Beobachtungen über die Stimulation der alkoholischen Gärung durch chemisch definierte Körper.

Von

T. Soda.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts
für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 16. Dezember 1922.)

Bei dem großen Interesse, das von den verschiedensten Richtungen her dem Problem der alkoholischen Gärung entgegengebracht wird, habe ich es für nützlich gehalten, die Frage nach der Stimulierung des Gärungsvorganges an neuen Aktivatoren zu studieren.

Man kennt, soweit man chemisch definierte Substanzen in Betracht zieht, bisher zwei Gruppen solcher Katalysatoren der Gärung. Einmal gehören hierhin die reduzierbaren Körper sowohl organischer als anorganischer Natur, sodann andere Stoffe, für die es schwer ist, eine gemeinsame Klassifizierung anzugeben.

Während Aldehyde, Ketone, Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen, Disulfide sowie desoxydierbare Mineralstoffe von Hefe reduziert werden können und dadurch den Vorgang der Zuckerspaltung zu beeinflussen vermögen, ist eine solche gemeinsame Beziehung für die andere Kategorie von Gärungsaktivatoren bisher nicht ersichtlich. Weder Salze der gewöhnlichen Fettsäuren und Oxysäuren, noch mehrwertige Alkohole, noch auch Tierkohle, sofern letztere direkt wirkt, dürften ihre Wirkung im Zusammenhang mit einer reduzierenden Tätigkeit entfalten. Hier können vorläufig nur die Tatsachen registriert werden.

Meine eigenen Untersuchungen erstreckten sich auf eine Reihe neuer Substanzen, die zu verschiedenen Gruppen zu zählen sind.

1. Reihe der Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen: das Trimethylaminoxid.
2. Ungesättigte Verbindungen: Zimtalkohol, Allylalkohol, α -Crotonsäure.
3. Diketosäuren: α , α_1 -Diketopimelinsäure.
4. Kompliziertere Ketone, wie Benzoylacetone und o-Methylcyclohexanon.

Für die Wahl dieser Substanzen waren folgende Gesichtspunkte maßgebend:

Die einzige in der Natur bisher nachgewiesene organische Stickstoff-Sauerstoff-Verbindung ist das Trimethylaminoxyd. Es findet sich ~~nach~~ den Untersuchungen des japanischen Forschers *Suwa*¹⁾ sowie nach solchen von *Henze*²⁾ in den Körpersäften bestimmter Seetiere. Da es nicht ausgeschlossen ist, daß Trimethylaminoxyd allgemeiner in der Natur vorkommt, beispielsweise unter den Extraktivstoffen der Muskulatur, so ist es vorstellbar, daß eine solche Stickstoff-Sauerstoff-Verbindung, falls sie den Gärungsprozeß beeinflusst, auch auf den hiermit verwandten Vorgang der Atmung einwirkt. Da Trimethylaminoxyd, wie bekannt, auf rein chemischem Wege reduzierbar ist, so fügt sich das beobachtete Aktivierungsvermögen des Trimethylaminoxids den früheren Feststellungen über die Gärungsbeschleunigung durch desoxydierbare Stoffe ein.

Für die Wahl der ungesättigten Verbindungen war gleichfalls der Gesichtspunkt der Reduzierbarkeit bestimmend. Wenn auch bislang Substanzen mit einer Doppelbindung phytochemisch nicht in durchsichtiger Weise hydriert sind, so befindet sich ein solcher Vorgang doch durchaus im Bereiche der Wahrscheinlichkeiten³⁾. Als zugängliche Vertreter der ungesättigten Verbindungen habe ich den Allylalkohol und Zimtalkohol und als eine saure Substanz die α -Crotonsäure verwendet. Für carbonylhaltige Substanzen liegt eine Reihe von Beobachtungen über das Vermögen zur Gärbeschleunigung vor. Einfache Diketone sind bereits mit Erfolg untersucht, dagegen noch keine Diketonsäuren. Als solche wählte ich die α , α_1 -Diketopimelinsäure. Als ein neues Diketon zog ich das Benzoylacetone heran und dehnte schließlich die Untersuchung auf das o-Methyl-cyclohexanon aus.

Die sämtlichen genannten Verbindungen erwiesen sich in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße als Gärungsstimulatoren. Ich will jedoch nicht unerwähnt lassen, daß ich mit anderen Stoffen aus den genannten Körperklassen unter den von mir gewählten Bedingungen auch negative Ergebnisse zu verzeichnen hatte. So habe ich mit den ungesättigten Säuren Fumarsäure, Maleinsäure, Itaconsäure und Aconitsäure vorläufig keine oder schwächere Gärungsförderungen beobachtet, ebenso mit der Lävulinsäure, die im Gegensatz zu den sonst untersuchten α -Ketonsäuren das Carbonyl in γ -Stellung enthält.

Um die Einflüsse auszuschließen, die durch Einwirkung der gewählten Substanzen auf lebende Zellen zustande kommen können,

¹⁾ *Suwa*, Pflügers Arch. 128, 421; 129, 231, 1909.

²⁾ *Henze*, H. 91, 230, 1914.

³⁾ Vgl. die von *Neuberg* und *Arinstein* im Jahre 1921 entwickelten Anschauungen über die natürliche Fettbildung d. Z. 117, 269.

habe ich stets mit zellfreien Säften gearbeitet und die Versuchsanordnung benutzt, wie sie schon in den ersten einschlägigen Untersuchungen von *Neuberg* mit *Ehrlich*, *Reinfurth* und *Sandberg*¹⁾ sowie neuerdings von *Jnouye*²⁾ getroffen worden ist.

Die Resultate ergeben sich aus nachfolgenden Übersichten.

Experimenteller Teil.

Die Versuche wurden ausgeführt mit frisch bereiteten Mazerations-säften aus untergärer Hefe. Es gelangten zur Anwendung jeweils auf 10,0 ccm Saft 2,0 ccm einer 5,0proz. Glucoselösung und 1,0 ccm der zu prüfenden Lösung des Aktivators, der gewöhnlich in einer Verdünnung von m/10, m/100 und m/1000 herangezogen wurde. Das Lösungsmittel war entweder reiner Alkohol oder Wasser, und dementsprechend wurde die dazugehörige Kontrolle mit 1,0 ccm Wasser oder 1,0 ccm Alkohol angesetzt. Die Vergärung wurde in 75 cm langen Eudiometern über Quecksilber als Sperrflüssigkeit vorgenommen. Alle Ansätze standen bei Zimmertemperatur. Gemessen wurde bei jeder Versuchsreihe die entwickelte Kohlensäuremenge nach gleichen Zeitabschnitten; sie gilt als Maß für die Intensität der Gärung und gestattet daher eine direkte Schlußfolgerung auf die Aktivierungsfähigkeit der jeweils angewandten Substanz. (Siehe *die beigegeführten Tabellen*).

Zusammenfassung.

Die zellfreie Gärung des Traubenzuckers kann eine Beschleunigung erfahren durch folgende Stoffe:

Trimethylaminoxid, Allylalkohol, Zimtalkohol, α -Crotonsäure, α , α_1 -Diketopimelinsäure, Benzoylacetone und o-Methylhexanon.

¹⁾ *Neuberg*, *Ehrlich*, *Reinfurth*, *Sandberg*, diese Zeitschr. 1918 bis 1921.

²⁾ *Jnouye*, Wochenschr. f. Brauerei 1922, S. 191.

A. Ansätze mit einer Stickstoff-Sauerstoff-Verbindung.

1. Versuche mit Trimethylaminoxyd. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.

a) 10 cem Saft, 2 cem 5proz. Glucoselösung, 1 cem m/10 Aktivator (wässrige Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 cem Wasser.

Temperatur 17,5° C.

	Zeiten nach Minuten																	
	100	110	120	130	140	145	150	155	160	170	180	190	200	220	240	265	280	1210
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,1	1,6	2,8	4,2	5,1	5,8	6,8	7,7	9,0	9,6	13,9
„ „ CO ₂ im Aktivatoransatz	0,4	0,6	0,8	1,4	2,4	3,2	4,0	4,7	5,5	6,5	7,1	7,7	8,3	8,9	9,5	10,2	10,4	13,4
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,3	0,4	0,5	1,0	1,9	2,6	3,2	3,6	3,9	3,7	2,9	2,6	2,5	2,1	1,8	1,2	0,8	-0,5

Die Aktivierung erreichte nach 160 Minuten ihren Höhepunkt.

b) Mit 1 cem m/100 Aktivator.

Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,1	1,6	2,8	4,2	5,1	5,8	6,8	7,7	9,0	9,6	13,9
„ „ CO ₂ im Aktivatoransatz	0,4	0,6	1,0	1,7	2,8	2,8	4,6	5,3	5,7	6,4	7,2	7,6	8,1	8,9	9,6	10,0	10,2	12,7
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,3	0,4	0,7	1,3	2,3	2,2	3,8	4,2	4,1	3,6	3,0	2,5	2,3	2,1	1,9	1,0	0,6	-1,2

c) Mit 1 cem m/1000 Aktivator.

Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,1	1,6	2,8	4,2	5,1	5,8	6,8	7,7	9,0	9,6	13,9
„ „ CO ₂ im Aktivatoransatz	0,4	0,6	0,9	1,5	2,6	3,5	4,4	5,1	5,6	6,6	7,4	8,0	8,5	9,4	10,0	10,5	10,7	12,4
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,3	0,4	0,6	1,1	2,1	2,9	3,6	4,0	4,0	3,8	3,2	2,9	2,7	2,6	2,3	1,5	1,1	-1,5

Auch für m/100 und m/1000 - Lösung war nach 160 Minuten das Maximum an stimulirender Wirkung erreicht.

Am günstigsten wirkte m/100-Lösung, doch bestanden keine wesentlichen Differenzen für die drei abgestuften Konzentrationen.

2. Versuche mit *Trimethylaminoxid-hydrochlorid*. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.

a) 10 cem Saft, 2 cem 5proz. Glucoselösung, 1 cem m/10 Aktivator (wässrige Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 cem Wasser.

Temperatur 17,5° C.

	Zeiten nach Minuten																	
	35	50	55	60	65	70	75	80	85	90	100	110	120	135	150	170	210	1140
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4	0,6	1,0	1,6	2,3	3,7	4,8	5,9	7,0	8,0	8,6	9,1	16,0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,3	0,5	0,8	1,3	1,7	2,2	2,9	3,8	5,0	5,7	6,5	7,1	7,6	8,3	8,9	9,6	10,2	14,4
„																		
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,2	0,4	0,7	1,0	1,4	1,8	2,3	2,8	3,4	3,4	2,8	2,3	1,7	1,3	0,9	1,0	1,1	— 1,6

b) Mit 1 cem m/100 Aktivator.

Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4	0,6	1,0	1,6	2,3	3,7	3,8	5,9	7,0	8,0	8,6	9,1	16,0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,4	0,7	1,2	1,7	2,4	3,3	4,3	5,4	6,3	7,1	7,8	8,3	8,8	9,2	9,5	9,8	15,8
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,1	0,3	0,6	0,9	1,4	2,0	2,7	3,3	3,8	4,0	3,4	3,0	2,4	1,8	1,2	0,9	0,7	— 0,2

c) Mit 1 cem m/1000 Aktivator.

Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4	0,6	1,0	1,6	2,3	3,7	4,8	5,9	7,0	8,0	8,6	9,1	16,0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,5	1,1	1,7	2,4	3,1	3,9	5,2	6,1	6,7	7,5	8,2	8,5	9,1	9,5	9,9	10,3	15,5
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,1	0,4	1,0	1,4	2,1	2,7	3,3	4,2	4,5	4,4	3,8	3,4	2,6	2,1	1,5	1,3	1,2	— 0,5

Das Chlorhydrat des Trimethylaminoxids zeigte mindestens ebenso günstige Wirkung wie die freie Base; mit zunehmender Verdünnung war ein Ansteigen derselben zu beobachten.

B. Ansätze mit ungesättigten Alkoholen.

1. Versuche mit Zimtalkohol. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.

a) 10 cem Saft, 2 cem 5proz. Glucoselösung, 1 cem m/100 Aktivator (alkoholische Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 cem Alkohol.

Temperatur 17,5° C.

	Zeiten nach Minuten											
	70	100	115	130	140	145	150	160	170	180	190	210
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,3	0,6	1,4	2,6	3,2	3,9	4,9	5,7	6,5	7,0	8,0
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,4	0,7	1,7	2,9	3,6	4,5	5,8	6,7	7,7	8,2	9,0
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4	0,6	0,9	1,0	1,2	1,2	1,0
												2,7

b) Mit 1 cem m/1000 Aktivator.

Temperatur 17,5° C.

	Zeiten nach Minuten											
	70	100	115	130	140	145	150	160	170	180	190	210
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,3	0,6	1,4	2,6	3,2	3,9	4,9	5,7	6,5	7,0	8,0
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,4	0,7	1,7	2,7	3,4	4,2	5,3	6,1	6,8	7,4	8,3
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
												1,0

Die katalysierende Fähigkeit war, wenn auch nicht sehr kräftig, so doch einwandfrei festzustellen; die Aktivator-konzentration von m/100 war die wirksamere.

2. Versuche mit *Allylalkohol*. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.

a) 10 cem Saft, 2 cem 5proz. Glucoselösung, 1 cem m/10 Aktivator (wässrige Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 cem Wasser.

Temperatur 18°C¹⁾.

	Zeiten nach Minuten													
	70	105	110	120	130	140	155	175	190	210	240	1220	1355	2795
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,2	0,3	0,5	2,2	3,8	5,2	6,8	8,3	9,2	9,8	10,3	12,0	12,8	15,6
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	1,6	3,6	4,7	6,1	7,0	7,9	9,0	9,9	10,4	11,0	11,2	14,3	15,0	16,6
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	1,4	3,3	4,2	3,9	3,2	2,7	2,2	1,6	1,2	1,2	0,9	2,3	2,2	1,0
b) Mit 1 cem m/100 Aktivator.														
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,2	0,3	0,5	2,2	3,8	5,2	6,8	8,3	9,2	9,8	10,3	12,0	12,8	15,6
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	0,4	1,2	2,3	4,5	5,5	6,5	7,8	9,0	9,6	10,0	10,5	13,6	13,8	16,2
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,2	0,9	1,8	2,3	1,7	1,3	1,0	0,7	0,4	0,2	0,2	1,6	1,0	0,6
c) Mit 1 cem m/1000 Aktivator.														
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0,2	0,3	0,5	2,2	3,8	5,2	6,8	8,3	9,2	9,8	10,3	12,0	12,8	15,6
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	0,4	1,1	2,1	4,4	5,4	6,5	7,8	8,7	9,4	10,1	10,6	13,1	13,6	16,4
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,2	0,8	1,6	2,2	1,6	1,3	1,0	0,4	0,2	0,3	0,3	1,1	0,8	0,8

Das Maximum schob sich mit zunehmender Verdünnung zeitlich hinaus; die aktivierende Wirkung war direkt proportional der Konzentration. Allylalkohol förderte die Gärung stärker als Zimtalkohol.

¹⁾ Die bei allen Ansätzen dieser Serie gleichmäßig zu beobachtende Abnahme der Gärintensität in dem Intervall zwischen 175 und 1220 Minuten beruht auf einer Temperaturschwankung.

C. Ansätze mit einer ungesättigten Säure.

1. Versuche mit *α-Crotonsäure*. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.
a) 10 ccm Saft, 2 ccm 5proz. Glucoselösung, 1 ccm m/10 Aktivator (wässrige Lösung).
Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 ccm Wasser.

Temperatur 18° C.

	Zeiten nach Minuten															
	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	130	140	150	165	185	1145
Entwickelte ccm CO ₂ in Kontrolle	0,2	0,2	0,4	1,0	1,4	2,3	2,8	3,7	4,4	5,1	6,3	7,0	7,7	8,5	10,4	15,0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,7	1,3	2,3	3,3	3,7	4,3	4,9	5,7	6,1	6,5	7,2	7,8	8,2	8,7	10,5	15,0
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,5	1,1	1,9	2,3	2,3	2,0	2,1	2,0	1,7	1,4	0,9	0,8	0,5	0,2	0,1	0
b) Mit 1 ccm m/100 Aktivator.																
Entwickelte ccm CO ₂ in Kontrolle	0,2	0,2	0,4	1,0	1,4	2,3	2,8	3,7	4,4	5,1	6,3	7,0	7,7	8,5	10,4	15,0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,4	0,7	1,3	2,1	3,7	4,5	5,3	5,8	6,4	7,4	8,0	8,7	9,3	10,9	14,7
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0	0,2	0,3	0,3	0,7	1,4	1,7	1,6	1,4	1,3	1,1	1,0	1,0	0,8	0,5	-0,3
c) Mit 1 ccm m/1000 Aktivator.																
Entwickelte ccm CO ₂ in Kontrolle	0,2	0,2	0,4	1,0	1,4	2,3	2,8	3,7	4,4	5,1	6,3	7,0	7,7	8,8	10,4	15,0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,4	0,6	1,2	1,9	3,4	4,2	5,0	5,5	6,0	7,1	7,9	8,6	9,3	10,6	15,2
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0	0,2	0,2	0,2	0,5	1,1	1,4	1,3	1,1	0,9	0,8	0,9	0,9	0,5	0,2	0,2

Mit zunehmender Konzentration erhöhte sich für die *α-Crotonsäure* die Stimulationskraft.

D. Ansätze mit einer Diketoäure.

Versuche mit α - α' -Diketopimelinsäure. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.

- a) 10 cem Saft, 2 cem 5proz. Glucoselösung, 1 cem m/100 Aktivator (alkoholische Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 cem Alkohol.

Temperatur 18° C.

	Zeiten nach Minuten											
	75	80	90	100	110	115	120	130	140	1120	1255	1450
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0	0	0	0,3	1,7	3,4	4,5	5,8	6,7	12,2	12,9	13,3
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	0,1	0,2	0,3	1,2	4,5	6,1	6,5	7,3	7,7	13,5	14,1	14,6
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,1	0,2	0,3	0,9	2,8	2,7	2,0	1,5	1,0	1,3	1,2	1,3

- b) Mit 1 cem m/1000 Aktivator.

Temperatur 18° C.

	Zeiten nach Minuten											
	55	65	75	80	90	100	110	115	120	130	140	1450
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0	0	0	0	0	0,3	1,7	3,4	4,5	5,8	6,7	12,9
" " CO ₂ im Aktivatoransatz	0,3	0,7	2,4	3,5	4,8	5,9	6,7	7,4	7,8	8,4	8,7	13,3
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle	0,3	0,7	2,4	3,5	4,8	5,6	5,0	4,0	3,3	2,6	2,0	1,1

Während die vorstehende Säure in m/10-Verdünnung die Gärung hemmte, übte sie in verringerter Konzentration eine deutlich positive Aktivatorwirkung aus; das Maximum lag zwischen 100 und 110 Minuten Gärzeit.

E. Ansätze mit einem Diketon.

Versuche mit Benzoylacetone. Saft aus Unterhefe Patzenhofer.

a) 10 ccm Saft, 2 ccm 5proz. Glucoselösung, 1 ccm m/10 Aktivator (alkoholische Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 ccm Alkohol.

Temperatur 18° C.

	Zeiten nach Minuten																			
	35	55	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	165	260	1220
Entwickelte ccm CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,6	0,8	1,3	1,7	2,2	2,7	3,2	3,8	4,2	4,7	5,0	5,4	5,6	6,0	6,5	7,2	8,1	9,9	15,5
" CO ₂ im Aktivatoransatz	0,3	1,0	1,7	2,4	3,1	3,8	4,5	5,1	5,9	6,4	6,9	7,2	7,8	8,2	8,7	9,0	9,3	10,1	11,4	14,5
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,2	0,4	0,9	1,1	1,4	1,6	1,8	1,9	2,1	2,2	2,2	2,2	2,4	2,6	2,7	2,5	2,1	2,0	1,5	1,0

b) Mit 1 ccm m/100 Aktivator.

Entwickelte ccm CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,6	0,8	1,3	1,7	2,2	2,7	3,2	3,8	4,2	4,7	5,0	5,4	5,6	6,0	6,5	7,2	8,1	9,9	15,5
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,1	0,6	0,8	1,2	1,8	2,5	3,0	3,4	4,0	4,9	5,6	6,0	6,6	7,0	7,5	7,9	8,3	9,5	10,9	14,9
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0	0	0	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,7	0,9	1,0	1,2	1,4	1,5	1,4	1,1	1,4	1,0	0,6

c) Mit 1 ccm m/1000 Aktivator.

Entwickelte ccm CO ₂ in Kontrolle	0,1	0,6	0,8	1,3	1,7	2,2	2,7	3,2	3,8	4,2	4,7	5,0	5,4	5,6	6,0	6,5	7,2	8,1	9,9	15,5
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,1	0,5	1,0	1,4	2,0	2,5	3,0	3,6	4,2	4,9	5,3	5,6	6,0	6,5	7,1	7,5	7,9	9,4	10,9	14,0
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,7	0,6	0,6	0,6	0,9	1,1	1,0	0,7	1,3	1,0	1,5

Für dieses Diketon war eine wesentliche Förderung nur bei m/10 Lösung vorhanden; mit zunehmender Verdünnung ging die Stimulation zurück.

F. Ansätze mit einem zyklischen Keton.

Versuche mit *o*-Methylcyclohexanon. Saft aus Unterhufe Patzenhofer.

a) 10 cem Saft, 2 cem 5 proz. Glucoselösung, 1 cem m/10 Aktivator (alkoholische Lösung).

Für die Kontrolle statt des Aktivators 1 cem Alkohol.

Temperatur 17,5° C.

	Zeiten nach Minuten															
	35	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	105	115	125	135
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,4	1,3	2,0	3,2	4,0	4,7	5,3	5,8	6,3	6,8	7,2	7,8	8,4	8,9	9,4	9,8
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,4	1,3	1,8	3,0	3,6	4,3	4,6	4,9	5,1	5,2	4,9	4,4	3,9	3,5	3,0	2,7
												2,4	1,9	1,7	1,3	1,3
																1,4

b) Mit 1 cem m/100 Aktivator.

Temperatur 17,5° C.

	Zeiten nach Minuten															
	35	45	50	55	60	65	70	75	80	90	95	105	115	125	135	145
Entwickelte cem CO ₂ in Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CO ₂ im Aktivatoransatz	0,2	0,6	0,8	1,3	1,8	2,3	3,1	3,5	3,8	4,7	5,5	6,0	6,7	7,4	7,9	8,3
Beschleunigung gegenüber der Kontrolle .	0,2	0,6	0,6	1,1	1,4	1,9	2,4	2,6	2,6	2,4	2,1	1,5	1,3	1,0	0,8	0,4
																0,1
																-0,1
																+0,4

Dieses Ringketon war ein guter Katalysator; es wirkte am stärksten in m/10-Lösung und behielt auch nach 1220 Minuten seinen Aktivatoreffekt bei. In einer Verdünnung auf m/1000 blieb die Stimulation aus.

Zur Kenntnis der Glucose-mono-schwefelsäure und Rohrzucker-mono-schwefelsäure.

V. Mitteilung¹⁾).

Von

T. Soda.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts
für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 23. Dezember 1922.)

Während Schwefelsäureester der Zuckerarten oftmals im Tierreich gefunden worden sind, hat man sie selten in pflanzlichen Organismen angetroffen; jedoch scheinen sie auch hier eine größere und unerwartete Verbreitung zu haben. So erkannten *Neuberg* und *Ohle*²⁾, daß der Agar ein Schwefelsäureester eines hochmolekularen Kohlenhydrats ist, und zu dem gleichen Ergebnis sind, unabhängig von den beiden genannten Autoren, *Samec* und *Ssajević*³⁾ gekommen; ebenso haben *Haas*⁴⁾ und ganz neuerdings *Russel-Wells*⁵⁾ das Auftreten von Äthersulfaten bei *Chondrus crispus* beschrieben.

Damit haben solche Verbindungen ein besonderes Interesse erlangt, und die synthetische Bereitung von Zucker-schwefelsäuren stellt sich als eine lohnende Aufgabe dar.

Methoden zur Gewinnung von Schwefelsäureestern der Kohlenhydrate sind bereits ausgearbeitet¹⁾; sie sind von *Neuberg* und *Pollak*, *Neuberg* und *Liebermann* sowie *Ohle* angegeben worden.

Bei dem ursprünglichen Verfahren wurde als Methode zur Darstellung von Ätherschwefelsäuren die Behandlung der hydroxylhaltigen

¹⁾ Frühere Mitteilungen: *C. Neuberg* und *H. Pollak*, diese Zeitschr. **26**, 514, 1910; *Ber.* **48**, 2060, 1910; *C. Neuberg* u. *L. Liebermann*, diese Zeitschr. **121**, 326, 1921; *H. Ohle*, ebendasselbst **131**, 601, 1922.

²⁾ *C. Neuberg* und *H. Ohle*, ebendasselbst **125**, 311, 1921.

³⁾ *M. Samec* und *V. Ssajević*, *Chem. Centralbl.* **22**, I, 1113.

⁴⁾ *P. Haas*, ebendasselbst **21**, III., 1248.

⁵⁾ *B. Russel-Wells*, *Biochem. Journal* **16**, 578, 1922.

Verbindungen mit Kaliumpyrosulfat und Ätzkali gewählt. Die notwendige Anwesenheit des letzteren beschränkt die Prozedur auf die Veresterung von Verbindungen, die gegen starke Lauge beständig sind, wie etwa der Rohrzucker. Die erweiternde Methode beruht auf einer Reaktion der Kohlenhydrate mit Chlorsulfonsäure in Pyridin-Chloroform-Lösung. Bei diesem Vorgehen vermag man ersichtlicherwise auch aldehydische oder ketonische Zucker in Schwefelsäureester umzuwandeln. Nach Zugabe von Carbonaten oder Hydroxyden der Erdalkalien kann man sodann das gesamte Pyridin fortschaffen und zugleich nicht in Reaktion getretene Chlor- und Sulfationen binden. Die Trennung beispielsweise von Gips bietet keine Schwierigkeiten, größere die der Entfernung daneben gebildeten Chlorcalciums; man kann versuchen, das Kalksalz der entstandenen Kohlenhydrat-schwefelsäure mit Alkohol niederzuschlagen, wobei Calciumchlorid in Lösung bleibt. Scheinbar entstehen jedoch öfter Doppelverbindungen von zucker-schwefelsaurem Calcium mit CaCl_2 , so daß die Beseitigung des Calciumchlorids verlustreiche Umfällungen verlangt.

Daher bin ich dazu übergegangen, die Synthese zunächst eines *Schwefelsäureesters der Glucose* nach folgendem Verfahren zu bewirken: Man läßt auf Traubenzucker in absolutem Pyridin die nicht ganz äquivalente Menge von Chlorsulfonsäure im Gemisch mit Chloroform einwirken. Der entstandene Glucose-mono-schwefelsäureester kann auf verschiedene Weise isoliert werden, am zweckmäßigsten folgendermaßen: Nach Abtreiben der Lösungsmittel Chloroform und Pyridin im Vakuum wird der Destillationsrückstand in Wasser gelöst und von vorhandenen Sulfat- und Chlorionen durch Schütteln mit Bariumcarbonat und Bleioxyd befreit; die letzten Reste des Halogens werden mit Silbersulfat beseitigt. Darauf fällt man mit Schwefelwasserstoff die in Lösung befindlichen Metalle Blei und Silber aus. Nimmt man diese Behandlung bei Gegenwart von kohlensaurem Barium vor, so findet keine Zersetzung der Glucose-mono-schwefelsäure statt, und man erhält eine Lösung ihres Bariumsalzes, das mittels absoluten Alkohols in fester Form abgeschieden werden kann. Diese Bariumverbindung ist noch nicht einheitlich, doch läßt sich aus ihr ein schön kristallisiertes Brucinsalz erhalten, das durch einmaliges Umlösen analysenrein ist und konstante Drehung aufweist.

Aus diesem Brucinsalz der Glucose-mono-schwefelsäure gewinnt man durch Umsetzung mit kaltem Barytwasser und alsbaldige Entfernung des überschüssigen Bariumhydroxyds mittels CO_2 sowie durch Zugabe von Weingeist nunmehr ein reines Bariumsalz der Glucose-mono-schwefelsäure, das sich unter diesen Umständen mit Kristallalkohol abscheidet.

Auf analoge Weise läßt sich auch eine *Rohrzucker-mono-schwefelsäure* darstellen. Hier kann man direkt — ohne den Umweg über das Alkaloidsalz — zu einer der Analyse nach einheitlichen Bariumverbindung gelangen; sie ist verschieden von dem Material, das früher mit anderer Methodik von *Neuberg* und *Pollak* (s. vorher) bereitet worden war.

Die Glucose-mono-schwefelsäure konnte als Na-Salz durch Hefe nicht in Gärung versetzt werden; auch wird die Schwefelsäure beim Stehen mit Hefe und Toluol nicht abgespalten. Rohrzucker-mono-schwefelsaures Salz verhält sich gegen Hefe folgendermaßen: Es wird vergoren und von Invertase zerlegt; demnach kann die eintretende Gärung auf die zymatische Spaltung des nicht sulfurylierten Monosaccharidrestes bezogen werden. Durch das *Verhalten zu Hefe* unterscheidet sich die Glucose-mono-schwefelsäure charakteristisch von der ähnlich gebauten Glucose-mono-phosphorsäure, indem diese sowohl gespalten als vergoren wird. Diese Eigenart entspricht der Tatsache, daß Phosphatasen in der Natur¹⁾ und insbesondere in der Hefe²⁾, angetroffen werden, die Phosphorsäure auch aus *künstlich phosphorylierten Verbindungen* ablösen.

Die Einzelheiten, welche sich auf die Darstellung von Glucose- und Saccharose-mono-schwefelsäure beziehen, sind in nachstehenden Ausführungen niedergelegt.

Glucose-mono-schwefelsäure.

Die *Veresterung der Glucose mit Schwefelsäure* wurde gemäß den geschilderten Richtlinien ausgeführt. 16,5 g getrocknete und fein gepulverte Glucose werden in einem großen, weiten und dickwandigen Reagenzglas, das ein Volumen von etwa 200 ccm hat, in 75 ccm Pyridin mittels eines Rührwerkes fein verteilt. Die Suspension wird von außen mit einer Kältemischung gekühlt, und nachdem die Innentemperatur auf etwa -10° gefallen ist, läßt man aus einem Scheidetrichter langsam eine Mischung von 5 ccm Chlorsulfonsäure und 18 ccm Chloroform zutropfen. Man arbeitet zweckmäßig mit einem Überschuß von Glucose, und zwar erwies es sich am günstigsten, einen Überschuß von 3 g = etwa 18 % des Zuckers anzuwenden. Nachdem ungefähr die Hälfte der Chlorsulfonsäure zugeflossen ist, beginnt die Ausscheidung des Pyridinsalzes der Glucose-mono-schwefelsäure in Form eines zähen Sirups, der noch unangegriffene Glucose einschließt und die weitere Umsetzung derselben mit der Chlorsulfonsäure erschwert. Sobald die gesamte Chlorsulfonsäure zugefügt ist, entfernt man die Kühlung und

¹⁾ C. Neuberg und W. Oertel, diese Zeitschr. **60**, 491, 1914; A. Nemeč und F. Duchon, ebendasselbst **119**, 74, 1921; M. Tomita, ebendasselbst **181**, 161 und 170, 1922.

²⁾ K. Djenab und C. Neuberg, ebendasselbst **82**, 391, 1917.

überläßt das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur unter stetigem Rühren sich selbst. Nach Stehen über Nacht werden Chloroform und überschüssiges Pyridin im Vakuum bei etwa 50° abdestilliert, wonach ein homogener hellgelber Sirup zurückbleibt, der noch stark nach Pyridin riecht.

Zur Isolierung von Salzen der Glucose-mono-schwefelsäure wurden mehrere neue Wege eingeschlagen. Zunächst wurde der Versuch gemacht, durch Anwendung verschiedener Lösungsmittel das Pyridinsalz in kristallisierter Form abzuscheiden, doch waren bislang alle Bemühungen in dieser Richtung erfolglos. Auch die Abtrennung des unveränderten Traubenzuckers durch Auflösung des Reaktionsgutes in Methylalkohol führte zu keinem brauchbaren Ergebnis, da ein beträchtlicher Teil des Zuckers in Lösung gehalten werden kann. Bei den einzelnen Ansätzen blieben wechselnde Mengen, von Spuren bis 4 g, Zucker bei dieser Operation zurück. Aus der methylalkoholischen Lösung, die zweckmäßig vorher noch eingeeengt wird, kann man das Pyridinsalz mit Äthylalkohol wieder ausfällen, doch erhält man immer einen Sirup, der keine Neigung zur Kristallisation zeigt und noch große Mengen Pyridinsulfat einschließt. Auch Pyridinchlorhydrat ist darin enthalten, allerdings nur in untergeordneter Menge, so daß durch Wiederholung der Operationen das Produkt nahezu chlorfrei gemacht werden kann. Zur Isolierung des Bariumsulfates ist indessen noch immer eine Behandlung mit Silbersulfat notwendig, um die Chlorionen quantitativ zu entfernen. Dieses Verfahren bietet somit vor dem nachstehenden keinen wesentlichen Vorzug, da auch die Ausbeuten nicht größer sind. Es wurde also schließlich folgender Weg gewählt: Der nach Abtreiben von Chloroform und Pyridin verbliebene Destillationsrückstand wurde in Wasser gelöst und mit einem Gemisch von Bariumcarbonat und Bleioxyd über Nacht geschüttelt. Dadurch wird alles Sulfat und der größte Teil des Chlors fortgeschafft. Nachdem man die anorganischen Salze abfiltriert hat, schüttelt man zur Entfernung von Pyridinresten viermal mit Äther gut aus und versetzt die wässrige Schicht so lange mit Silbersulfat, bis in einer abfiltrierten Probe keine Chlorionen mehr nachweisbar sind. Der aus Chlorsilber und (aus löslichen Ba-Salzen neu gebildetem) Bariumsulfat bestehende Niederschlag wird abgesaugt und aus dem Filtrat der Silberüberschuß und das als Salz der Glucose-schwefelsäure in der Lösung befindliche Blei mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Zur Bindung der dabei freiwerdenden Glucose-schwefelsäure fügt man als Bodenkörper Bariumcarbonat hinzu. Die vom Gemisch der Sulfide und vom überschüssigen kohlensauren Barium getrennte Flüssigkeit wird zur Entfernung des darin gelösten Schwefelwasserstoffs mit Kohlensäure behandelt und schließlich im Vakuum bei 40° auf 20 bis 15 cm eingeeengt. Dabei trübt sich die Lösung etwas infolge Aus-

scheidung von Bariumcarbonat, das durch ein Kieselgurfilter zurückgehalten wird. Die klare Lösung läßt man dann langsam und unter Rühren in 1 Liter absoluten Alkohols eintropfen, wobei sich das Bariumsalz der Glucose-mono-schwefelsäure in weißen Flocken abscheidet. Man läßt den Niederschlag absitzen, saugt rasch ab, wäscht schnell mit Alkohol nach und bringt das Rohprodukt sofort in einen Vakuum-exsikkator, da es recht hygroskopisch ist und bei zu langer Berührung mit der Luft zerfließt. Die Ausbeute beträgt 7 g. Es stellt noch keine reine Substanz dar, da die bei verschiedenen Ansätzen erhaltenen Präparate einen zu niedrigen Bariumgehalt aufwiesen.

Die Gewinnung des reinen Bariumsalzes läßt sich über das Brucinsalz bewerkstelligen.

Zur Darstellung des *Brucinsalzes der Glucose-mono-schwefelsäure* versetzt man eine Lösung von 20,3 g des rohen (und ungetrockneten) Bariumsalzes, das einen Bariumgehalt von 13,5 % besaß, mit einer Lösung von Brucinsulfat, dessen Menge nach dem Bariumgehalt des Ausgangsmaterials berechnet wurde. In diesem Falle waren dazu 15,7 g Brucin und 40 ccm n-Schwefelsäure erforderlich, die in 200 ccm Wasser und 60 ccm Aceton gelöst wurden. Die Beigabe von Aceton bezweckt eine bessere Auflösung des Brucinsulfats. Die vom Bariumsulfat befreite Flüssigkeit wurde nun im Vakuum so lange eingedampft, bis sich Kristalle abzuschcheiden begannen. Diese wurden durch Erwärmen wieder in Lösung gebracht und die Flüssigkeit in ein Becherglas umgegossen. Zu der warmen Lösung fügte man dann langsam unter Rühren und Reiben an den Glaswänden 80 ccm Aceton hinzu. Dabei kristallisierte das Brucinsalz in kleinen Blättchen aus. Zur Vervollständigung der Kristallisation bewahrt man noch einige Stunden im Eisschrank auf, saugt dann ab und wäscht mit Alkohol. Die Ausbeute beträgt 14,7 g. Die Verbindung schmolz nach vorherigem Sintern bei 180° unter starkem Schäumen und unter Braunfärbung. Nach nochmaliger Umkristallisation aus Wasser mit Aceton fing sie bei 170° an zu sintern und schmolz bei 183° unter Schäumen und Dunkelfärbung. Das Salz zeigte Mutarotation. Die spezifische Drehung dieses Produktes in wässriger Lösung betrug nach etwa 20 Minuten

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,14 \cdot 100}{2,766 \cdot 2} = -2,53^{\circ}$$

und hatte sich nach etwa 24 Stunden auf ihren Endwert

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,31 \cdot 100}{2,766 \cdot 2} = -5,60^{\circ}$$

eingestellt.

Durch weiteres Umkristallisieren wurden weder Schmelzpunkt noch Rotation verändert.

Ein zweites Präparat ergab bei der Bestimmung der Drehung

$$[\alpha]_D^{18,5} = \frac{-0,04 \cdot 100}{2,654 \cdot 2} = -0,75^\circ,$$

nach 10 Minuten und schließlich

$$[\alpha]_D^{18,5} = \frac{-0,30 \cdot 100}{2,654 \cdot 2} = -5,65^\circ.$$

Die Analyse zeigte, daß das Brucinsalz mit $\frac{1}{2}$ Mol. Wasser kristallisiert, das es selbst durch Trocknen bei etwa 80° im Vakuum über Phosphor-pentoxyd nicht verliert.

0,1490 g Substanz gaben 0,2853 g CO_2 und 0,0769 g H_2O ;

0,3289 g Substanz gaben 0,1164 g BaSO_4 .

Gefunden C = 52,23 %, H = 5,73 %, S = 4,86 %.

Die Zahlen stimmen gut auf die Verbindung $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6\text{SO}_3\text{H} + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (= 663,5), für die berechnet wird:

C = 52,45 %, H = 5,87 %, S = 4,82 %.

Erwärmt man die vorgetrocknete Substanz bei 100° bis zur Gewichtskonstanz, so verlieren 0,2228 g noch 0,0034 g an Gewicht, was einer Abnahme von 1,53 % entspricht, während für die Abgabe von $\frac{1}{2}$ Mol. Wasser sich eine Gewichtsverminderung von 1,36 % berechnet. Das Brucinsalz ist in kaltem Wasser leicht löslich, in Methylalkohol beträchtlich weniger. Es wird von Äthylalkohol selbst in der Wärme nur in kleinen Mengen aufgenommen, in Chloroform löst es sich glatt.

Zur Umwandlung des Brucinsalzes in das *Bariumsalz* wurden 18 g des ersteren in etwa 50 ccm Wasser gelöst und mit einem geringen Überschuß einer kalt gesättigten Barytlösung, die aus sorgfältig umkristallisiertem $\text{Ba}(\text{OH})_2$ hergestellt worden war, versetzt. Der Überschuß der Base wird sofort mit Kohlensäure neutralisiert, der Niederschlag von Bariumcarbonat nebst Brucin abgesaugt und das Filtrat zur Entfernung der in Lösung gebliebenen Alkaloidreste zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die im Vakuum eingeeengte wässrige Lösung des Bariumsalzes läßt man dann, wie eingangs beschrieben, in Alkohol eintropfen, wobei das Bariumsalz nunmehr in reiner Form ausfällt. Die Ausbeute machte 8,5 g aus. Bei einem zweiten Ansatz wurden aus 13 g Brucinsalz 5,7 g Bariumsalz erhalten.

In dem so gewonnenen Produkte waren nach mehrtägigem Trocknen bei Zimmertemperatur über Chlorcalcium noch beträchtliche Mengen Alkohol vorhanden, die mittels der Jodoformreaktion nachgewiesen wurden. Auf Grund der Barium- und Schwefelbestimmungen betrug der Alkoholgehalt dieses Produktes 2 Mol. Es wurden gefunden:

1. aus 0,6410 g Substanz 0,1985 g BaSO_4 = 18,20 % Ba.
2. „ 0,5466 g „ 0,1702 g BaSO_4 = 18,33 % Ba,
3. „ 0,3225 g „ 0,2050 g BaSO_4 = 8,73 % S,

während für das Salz $(C_6H_{11}O_6SO_3)_2Ba + 2 C_2H_5O (= 747,4)$ ein Bariumgehalt von 18,38 % und ein S-Gehalt von 8,57 % berechnet wird. Durch langes Aufbewahren bei Zimmertemperatur (etwa 4 Monate) über Chlorcalcium verliert dieses Salz 1 Mol. Alkohol, wie sich aus den folgenden Analysen ergibt:

0,1235 g Substanz gaben 0,1053 g CO_2 und 0,0480 g H_2O ;
 0,1080 g Substanz gaben 0,0354 g $BaSO_4$.

	C	H	Ba
Gefunden	23,36 %	4,32 %	19,29 %;
berechnet für Ba-Salz + 1 C_2H_5O	23,98 %	3,99 %	19,55 %.
(= 701).			

Erwärmt man die bei Zimmertemperatur zur ersten Gewichtskonstanz getrocknete Substanz im Vakuum auf 80° , so verliert sie ebenfalls nur 1 Mol. Alkohol, entsprechend einer Gewichtsabnahme von 6,17 % (ber. 6,15 %).

Das restliche Molekül Alkohol wird zähe festgehalten und entweicht bei höherer Temperatur nur unter gleichzeitiger Zersetzung des Salzes. Der Schwefelgehalt eines wie oben getrockneten Präparats betrug 8,93 % (0,4140 g Substanz lieferten 0,2694 g $BaSO_4$), während der Theorie ein Wert von 9,15 % Schwefel entspricht. Ein zweites in der gleichen Weise getrocknetes Präparat ergab bei der Analyse folgende Werte:

Aus 0,2654 g Substanz entstanden 0,0883 g $BaSO_4 = 19,58\%$ Ba.

Die spezifische Drehung des bei Zimmertemperatur getrockneten Salzes war in wässriger Lösung

$$[\alpha]_D^{19} = \frac{+ 2,87 \cdot 100}{4,525 \cdot 2} = + 31,71^{\circ}.$$

Für ein anderes Präparat wurde gefunden

$$[\alpha]_D^{17} = \frac{+ 2,01 \cdot 100}{3,110 \cdot 2} = + 32,32^{\circ}.$$

Rohrzucker-mono-schwefelsäure.

Das Bariumsalz der Saccharose-schwefelsäure wurde in analoger Weise bereitet. 20 g fein gepulverter und gut getrockneter Rohrzucker wurden in 75 ccm Pyridin suspendiert und unter Kühlen in einer Kältemischung tropfenweise mit einer Mischung von 3,5 ccm Chlorsulfonsäure plus 10 ccm Chloroform versetzt. Nachdem man das Reaktionsgut über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt hat, wurde die Pyridinlösung von dem als zäher Sirup ausgefallenen Pyridinsalz der Rohrzuckerschweifelsäure abgegossen und das Produkt durch Digerieren mit Methylalkohol von der nicht in die Reaktion eingetretenen Saccharose

(7 bis 8 g) getrennt. Die Pyridinschicht enthielt nur geringe Mengen organisch gebundenen Schwefels und konnte daher vernachlässigt werden. Die methyllkoholische Lösung wurde mit Wasser verdünnt und in der beschriebenen Weise mit Bleioxyd, Bariumcarbonat und Silber-sulfat behandelt. Aus der chlör- und sulfatfreien wässrigen Lösung wurde das Bariumsalz der Rohrzucker-schwefelsäure durch Eintropfen in Alkohol gefällt. Die Ausbeute belief sich auf 7 g. Dieses Rohprodukt zeigte einen Bariumgehalt von 11,72 %. Durch nochmaliges Umfällen aus Wasser mittels Alkohol stieg der Bariumgehalt auf 12,95 %. Das so gewonnene Präparat enthielt noch 2 Mol. Alkohol, die es beim Trocknen bei 80° im Vakuum über Phosphorpentoxyd abgab. Dem Salz $(C_{12}H_{21}O_{11}SO_3)_2Ba + 2C_2H_5O$ entspricht ein Ba-Gehalt von 12,82 %.

0,2576 g Substanz verloren 0,0231 g an Gewicht, gemäß einer Abnahme von 8,90 %, während sich für das Entweichen von 2 Mol. Alkohol 8,59 % berechnen.

0,2345 g Substanz ergaben 0,1116 g $BaSO_4$.

$(C_{12}H_{21}O_{11}SO_3)_2Ba$ (= 979,4). Ber. S = 6,62 %; gef. S = 6,53 %.

Die spezifische Drehung dieses Salzes betrug

$$[\alpha]_D^{22} = \frac{+2,42 \cdot 100}{3,215 \cdot 2} = +37,64^\circ.$$

Berichtigung

zu der Arbeit von *B. Stuber* und *M. Sano*: Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung, Bd. 134, Heft 1 bis 4.

Seite 241, Zeile 18 von oben muß es heißen:

Die Fibrinogenlösung statt die Thrombinlösung.

Autorenverzeichnis.

- Adowa, A. N.* s. *Smorodinzew*.
- Bach, A., B. Sbarsky* u. *K. Nikolajew*. Scheinbare auxo- und antifermentative Eigenschaften des Serums. S. 32.
- Bach, A.* und *W. Engelhardt*. Über Antiphenolase (Antilakkase). S. 39.
- Beckmann, Kurt*. Hämolyseversuche in Alkali- u. Erdalkalisalzen unter normalen und pathologischen Bedingungen. S. 317.
- Biedermann, W.* Die Salzhydrolyse der Stärke. S. 282.
- Bleyer, B.* und *H. Schmidt*. Studien über das Verhalten der wichtigsten Kohlehydrate (Glucose, Galactose, Fructose, Mannose, Maltose, Lactose, Saccharose) in stark saurer, alkalischer, sulfid- und bisulfithaltiger Lösung. I. Mitteilung: Die Inversion d. Lactose mit starken Säuren. S. 546.
- Blühdorn, Kurt* und *Grete Genck*. Zur Kritik der de Waardtschen Mikromethode. S. 581.
- Borak, Jonas*. Über den Einfluß des Säuren- und Basengehalts der Nahrung auf die Zusammensetzung des Harns wachsender Hunde. S. 480.
- Bornstein, A.* s. *Holm*.
- Eisler, M.* Über die Reaktion von Antigen und Antikörper nach Bindung des einen von ihnen an Kohle. S. 416.
- Eisler, M.* und *L. Portheim*. Über die Bildung von Sauerstoff aus Kohlendioxyd durch Eiweiß-Chlorophylllösungen. S. 293.
- Engelhardt, W.* s. *Bach*.
- Faludi, Franz* s. *Gerlőczy*.
- Franzen, Hartwig* und *Ernst Keyssner*. Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. XXIII. Mitteilung: Kritisches über das Vorkommen der Äpfelsäure in den Pflanzen. S. 183.
- Franzen, Hartwig* und *Fritz Helwert*. Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen. XXIV. Mitteilung: Kritisches über das Vorkommen der Citronensäure in den Pflanzen. S. 384.
- Genck, Grete* s. *Blühdorn*.
- Gerlőczy, Géza v.* und *Franz Faludi*. Stabilitätskoeffizient der Blutstruktur. S. 158.
- Goto, Kiko*. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Wärmeregulation der Säugetiere. III. Wärmeregulation der weißen Ratte. S. 107.
- Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatorporphyrins. I. S. 329.
- Haehn, Hugo*. Abbau der Stärke durch ein System: Neutralsalze + Aminosäuren + Pepton. S. 587.
- Hagedorn, H. C.* u. *B. Norman Jensen*. Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferrieyanid. S. 46.
- Hári, Paul*. Beiträge zur Lichtabsorption des Hämatorporphyrins. II. S. 344.
- Helwert, Fritz* s. *Franzen*.
- Heubner, W.* und *P. Rona*. Über den Kalkgehalt der Organe bei kalkbehandelten Katzen. S. 248.

- Hirai, Kinsaburo.* Über das Vorkommen von p-Oxybenzaldehyd und p-Oxybenzoesäure bei der bakteriellen Tyrosinzerersetzung, mit besonderer Berücksichtigung des dabei gebildeten Melanins. S. 299.
- Hishikawa, T.* Über die Bestimmung zell- und keimschädigender Substanzen auf biologischem Wege. III. Mitteilung. Chinin. S. 576.
- Holm, Kurt und A. Bornstein.* Über den Einfluß der Schilddrüse auf einige toxische Glykämien. S. 532.
- Hoop, L. de u. M. J. van Tussenbroek.* Über den Einfluß von Dextrinen auf die Kristallisation von Maltose. S. 217.
- Iwanoff, Nicolaus N.* Über die Umwandlung des Harnstoffs beim Reifen der Fruchtkörper von Lycoperdon. S. 1.
- Jensen, Norman B. s. Hagedorn.*
- Kalff, J. s. Waterman.*
- Keyssner, Ernst s. Franzen.*
- Krzywanek, Fr. W.* Über die Verwendbarkeit des Zuntz-Geppert-Apparates bei Respirationsversuchen mit kleinen Tieren. S. 506.
- Kürten, H.* Untersuchungen über die Wirkungsweise von Formaldehyd auf Organkolloide. II. Mitteilung. Formaldehyd und Eiweißquotient. S. 536.
- Lieben, Fritz.* Über das Verhalten von Brenztraubensäure und Acetaldehyd gegenüber mit Sauerstoff gelüfteter Hefe. S. 240.
- Loll, Wilhelm.* Die quantitative Analyse der Knochenasche bei Kriegoosteopathie. S. 493.
- Löw, A. s. Spiegel.*
- Manskaja, S. s. Palladin.*
- Meier, Klothilde s. Straub.*
- Meyer-Bisch, Robert u. Paul Thyssen.* Untersuchung über den Mineralstoffwechsel bei Zuckerkranken. I. Mitteilung. S. 308.
- Meyerhof, O. und H. Weber.* Beiträge zu den Oxydationsvorgängen am Kohlemodell. S. 558.
- Morinaka, Kiyoshi.* Wirkt Vitaminmangel spezifisch oxydationshemmend? S. 603.
- Nikolajew, K. s. Bach.*
- Nishiguchi, H.* Über ein Phänomen bei der Agglutination von Typhusbazillen in salzarmem Medium. S. 165.
- Orient, Julius.* Über ein neues Reagenzglas. S. 182.
- Otsuka, Ichiro s. Sasaki.*
- Palladin †, W. und Fr. S. Manskaja.* Die Entstehung der Peroxydase in den Pflanzen. Die Bedingungen, welche die Abspaltung der Peroxydase von den Protoplasten und ihren Übergang in den Zellsaft hervorrufen. S. 142.
- Pary, Eugen.* Zur Kenntnis der Bedingungen d. biologischen Wirkung der Röntgenstrahlen. III. Mitteilung: Wirkung von Oxydationsmitteln auf die Empfindlichkeit. S. 353.
- Portheim, L. s. Eisler.*
- Rippel, August.* Über die Mobilisation der Mineralstoffe und des Stickstoffs aus Holz und Rinde beim frühjahrlichen Austreiben. S. 518.
- Romeis, B.* Untersuchungen über die Wirkung des Thyroxins. I. Mitteilung: Über die Wirkung des Thyroxins auf Körpergewicht und Leberglykogen weißer Mäuse. S. 85.
- Rona, P. s. Heubner.*
- Sarin, E.* Über Fermente der Verdauungsorgane der Honigbiene. S. 59.
- Weitere Studien über Invertase des Darmkanals der Honigbiene. S. 75.
- Sasaki, Takaoki und Ichiro Otsuka.* Über die Bildung der rechtsdrehenden β -Furyl- α -milchsäure durch Proteusbakterien. S. 504.
- Sbarsky, B.* Adsorption von Eiweißabbauprodukten durch die Formelemente des Blutes in vivo und in vitro. S. 21.
- Sbarsky, B. s. Bach.*
- Schmidt, H. s. Bleyer.*

Smorodinzew, J. A. und A. N. Adowa.
Der Einfluß verschiedener Präparate der Chiningruppe auf die fermentativen Funktionen des Organismus. Der Einfluß einiger Chinin- u. Harnstoffverbindungen auf die α -Proteasen. S. 128.
Soda, T. Neue Beobachtungen über die Stimulation der alkoholischen Gärung durch chemisch definierte Körper. S. 610.
 — Zur Kenntnis der Glucose-mono-schwefelsäure und Rohrzucker-mono-schwefelsäure. V. S. 621.
Spiegel, E. A. u. A. Löw. Der Kreatin-gehalt des Muskels bei anoxybi-otischer Zuckung. S. 122.

Straub, H. u. Klothilde Meier. Blut-gasanalysen. XII. Wirkungen des konstanten u. faradischen Stromes auf heterogene Systeme. S. 224.

Thyssen, Paul s. Meyer-Bisch.

Tussenbroek, M. J. van s. Hoop.

Tutschku, Karl. Pigmente und Pferde-haar. S. 585.

Umetsu, Kojiro. Beiträge zur Elektro-endosmose durch Kohlefilter. S. 442.

Waterman, N. und J. Kalff. Über Nitroreduktionen durch lebende Gewebe. S. 174.

Weber, H. s. Meyerhof.

RE

THE LIBRARY
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
San Francisco Medical Center
THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE STAMPED BELOW

7 DAY LOAN

7 DAY
FEB 13 1969

RETURNED
FEB 13 1969

25m-10,'67(H5524s4)4315